

**CARACTÉRISATION D'UN ANTIBIOTIQUE PRODUIT
PAR LA SOUCHE D'ACTINOMYCÈTE EF76 ANTAGONISTE À
PHYTOPHTHORA FRAGARIAE var. *RUBI* CAUSANT LE POURRIDIE
DES RACINES DU FRAMBOISIER.**

par

Vicky Toussaint

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, août 1996



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-26621-4

SOMMAIRE

Le champignon *Phytophthora fragariae* var. *rubi* est l'agent étiologique du pourridié des racines du framboisier. En 1989, cette maladie était présente dans plus de 50% des framboiseraies de l'Estrée. L'objectif ultime de notre recherche est de mettre sur pied une méthode de contrôle en lutte biologique contre le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* dans les framboiseraies.

Treize souches d'actinomycètes avaient, dans une étude antérieure, été sélectionnées pour leur capacité à dégrader le mycélium du *Phytophthora* et aussi pour leur capacité à inhiber la croissance du champignon *in vitro*.

Ces mêmes 13 souches d'actinomycètes ont ici été testées pour vérifier leur efficacité à inhiber la croissance de diverses espèces microbiennes. Toutes les espèces de *Pythium* testées ont été inhibées dans leur croissance par les 13 souches antagonistes. Pour les autres espèces de champignons testés, les résultats étaient très variables. Outre les oomycètes, les souches EF25 et N106 n'inhibaient la croissance d'aucune autre espèce de champignons. Les souches d'actinomycètes EF14, EF72 et EF76 ont inhibé la croissance de tous les champignons testés. Aucune des espèces bactériennes Gram négatif ont été inhibées dans leur croissance par les actinomycètes antagonistes, mais les souches DVD4, N106, EF14, EF72 et EF76 inhibaient la croissance d'au moins une espèce bactérienne Gram positif.

Nos travaux de recherche ont par la suite été dirigés sur la production d'antibiotique par la souche EF76. Un antibiotique a été isolé par des extractions au chloroforme du filtrat de culture de la souche EF76 et purifié par chromatographie sur couche mince. Les spectres RMN et de masse du produit ont été déterminés et ont permis d'identifier l'antibiotique

comme étant la geldanamycine. La production de geldanamycine avait été préalablement associée à l'espèce *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*. Le niveau d'homologie génétique entre la souche EF76 et *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 a été déterminé et était de 99,9%. De plus, les patrons de digestion des génomes de ces deux souches ont été comparés et ils présentaient une grande similitude entre eux. Tous ces facteurs réunis permettaient d'identifier la souche EF76 comme appartenant à l'espèce *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*.

Enfin, la souche EF76 ainsi que la souche EF14 ont démontré qu'elles étaient efficaces dans la lutte contre le *Phytophthora fragariae* var. *rubi in planta*. L'indice du pourridié a significativement diminué chez les plants inoculés avec les souches EF76 ou EF14 et avec le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* comparativement aux plants de framboisiers inoculés seulement avec le *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. Finalement, les souches d'actinomycètes EF76 et EF14 n'ont causé aucun dommage à la plante; les plants de framboisiers inoculés seulement avec les souches d'actinomycètes avaient la même apparence que les plants témoins non inoculés.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sentiments les plus sincères à ma directrice de recherche, le docteur Carole Beaulieu pour sa grande disponibilité, ses encouragements, son dynamisme, sa confiance, son expertise ainsi que son support financier qui a permis la réalisation de ce projet.

Je tiens à remercier de façon particulière mon co-directeur de recherche, le docteur Luc Ruest, pour sa patience, sa compréhension, sa disponibilité, son dynamisme et ses talents de chimiste sans quoi la réalisation de ce projet n'aurait pu être possible.

Je tiens à mentionner ma gratitude à mes conseillers de recherche, les docteurs Claude V. Déry et Ryszard Brzezinski pour leur précieuse collaboration et leurs judicieux conseils.

Merci à mes collègues de laboratoire avec lesquels j'ai passé d'agréables moments. Merci particulièrement à Claudia et Isabelle dont l'expérience m'a été d'un grand secours. Merci aussi à Diane, qui a initié ce projet et dont les résultats m'ont été très précieux. De plus, je tiens à remercier Marco Dodier, qui m'a toujours aidée lorsque j'avais besoin d'aide dans l'exécution des techniques chimiques qui ont été essentielles à la réalisation du projet. Sa patience, son dévouement ainsi que sa disponibilité furent plus qu'appréciés.

Je remercie grandement mes amis André, Michel K. et Philippe qui ont toujours été là quand j'avais besoin d'eux. Je remercie infiniment ma famille, maman, papa, Josée, Claude, Marc-André et Anne-Sophie qui sont pour moi très chers et qui m'ont toujours supportée et aimée. Enfin, merci à mon copain Michel que j'aime beaucoup et qui a su me convaincre d'aller encore plus loin. Merci.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	ii
REMERCIEMENTS	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES FIGURES	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	11
1.1 Souches de microorganismes et milieux de culture utilisés.	11
1.2 Inhibition de croissance de diverses espèces de champignons et de bactéries par les 13 souches d'actinomycètes antagonistes.	13
1.3 Pouvoir d'inhibition de croissance des surnageants de culture des actinomycètes sur le <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3.	14
1.4 Extraction de l'antibiotique produit par la souche de <i>Streptomyces</i> sp. EF76.	14

1.5	Isolement de l'antibiotique produit par <i>Streptomyces</i> sp. EF76 et <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55 256.	16
1.6	Identification de l'antibiotique produit par <i>Streptomyces</i> sp. EF76.	17
1.6.1	Spectre de masse de l'antibiotique produit par les souche de <i>Streptomyces</i> sp. EF76 et de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55256.	17
1.6.2	Spectre de résonance magnétique nucléaire de l'antibiotique produit par les souches de <i>Streptomyces</i> sp. EF76 et de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55256.	17
1.7	Extraction de l'ADN génomique des souches de <i>Streptomyces</i>	17
1.8	Hybridation entre l'ADN de la souche <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55256 et l'ADN des souches de <i>Streptomyces</i> sp. EF76 et de <i>Streptomyces scabies</i> EF46.	18
1.9	Digestion de l'ADN génomique des souches de <i>Streptomyces</i> sp. EF76, de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55256 et de <i>Streptomyces caviscabies</i> EF104.	18
1.10	Effet des souches de <i>Streptomyces</i> sp. EF76 et EF14 sur l'indice du pourridié des racines de framboisier.	19

CHAPITRE 2

RÉSULTATS	21
2.1 Inhibition de croissance de diverses espèces microbiennes par les souches d'actinomycètes antagonistes.	21
2.1.1 Inhibition de croissance de bactéries par les souches d'actinomycètes antagonistes.	21
2.1.2 Inhibition de croissance d'espèces de champignons par les souches	

	d'actinomycètes antagonistes.	22
2.2	Inhibition de croissance de <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3 par les surnageants de culture d'actinomycètes antagonistes.	23
2.3	Extractions du filtrat de culture de la souche de <i>Streptomyces</i> sp. EF76 avec différents solvants : effets des fractions obtenues sur la croissance de <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i>	25
2.4	Inhibition de croissance de <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3 par les produits de la fraction chloroforme séparés par CCM.	25
2.5	Spectre de masse et de résonance magnétique nucléaire de l'antibiotique purifié des souches de <i>Streptomyces</i> sp. EF76 et <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55256.	28
2.6	Comparaisons phénotypiques et génétiques entre la souche <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55256 et la souche de <i>Streptomyces</i> sp. EF76.	29
2.7	Effet des souches de <i>Streptomyces</i> sp. EF76 et EF14 sur l'indice du pourridié des racines de framboisier.	31
CHAPITRE 3		
	DISCUSSION	34
	ANNEXES	43
	BIBLIOGRAPHIE	48

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μl	:	microlitre
μm	:	micromètre
ADN	:	acide désoxyribonucléique
ATCC	:	“American type culture collection”
CCM	:	chromatographie sur couche mince
cm	:	centimètre
dCTP	:	désoxycytidyltriphosphate
g	:	gramme
l	:	litre
lbs	:	livres
m/e	:	“mass to charge ratio”
mg	:	milligramme
ml	:	millilitre
mm	:	millimètre
NA	:	milieu d’agar nutritif
ng	:	nanogramme
pc ²	:	pouce carré
PDA	:	milieu d’agar de patate dextrosé
ppm	:	partie par million
protéines PR	:	“pathogenesis-related proteines”
Rf	:	front de migration
RMN	:	résonance magnétique nucléaire
SLM3	:	milieu amidon et liqueur de maïs
STM	:	“structure molecule”

LISTE DES ABRÉVIATION (suite)

UV	:	rayons ultraviolets
V8A	:	agar de jus V8
YGM+	:	milieu d'extrait de levure et glucose
YME	:	milieu d'extrait de levure et de malt

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Microorganismes utilisés dans cette étude.	12
Tableau 2.	Traitement des plants de framboisiers certifiés.	20
Tableau 3.	Spectre d'inhibition de croissance de 10 espèces bactériennes par les 13 souches d'actinomycètes antagonistes au <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3.	22
Tableau 4.	Inhibition de croissance de neuf espèces de champignons par les 13 souches d'actinomycètes antagonistes au <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3. ..	24
Tableau 5.	Inhibition de croissance de <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3 par les différentes fractions obtenues à partir des filtrats de culture de la souche de <i>Streptomyces</i> sp. EF76.	26
Tableau 6.	Inhibition de croissance de <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3 par les six parties de la fraction chloroforme séparés par CCM.	28

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Inhibition de croissance du <i>Phytophthora</i> (A) par le surnageant de culture filtré et stérilisé de la souche de <i>Streptomyces</i> sp. EF76 (B) par la fraction chloroforme des extractions du surnageant de culture de la souche EF76.	27
Figure 2 :	Culture de (A) <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55256 et (B) <i>Streptomyces</i> sp. EF76 sur milieu YME après 10 jours de croissance.	30
Figure 3:	Patron de digestion de l'ADN génomique des souches de <i>Streptomyces</i> sp. EF76, <i>Streptomyces hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i> ATCC 55256 et <i>Streptomyces caviscabies</i> EF104.	32
Figure 4:	Indice du pourridié des racines du framboisier à la suite de divers traitements.	33

INTRODUCTION

Le *Phytophthora* est un champignon de la classe des oomycètes qui est depuis longtemps connu comme étant phytopathogène (Alexopoulos et Mims, 1979). Il fut baptisé en 1876 par Anton de Bary qui lui donna le nom de *Phytophthora* signifiant “Plant destroyer” (Zentmyer, 1987).

Les diverses espèces de *Phytophthora* causent une grande variété de symptômes chez plusieurs types de plantes. La plupart des espèces de *Phytophthora* causent des symptômes tels que la fonte des semis, la pourriture des racines (pourridié) et la pourriture des parties aériennes des plantes. Certaines espèces de *Phytophthora* sont très spécifiques quant à leur hôte, tandis que d'autres ont un large éventail d'hôtes. L'espèce la plus connue est sans aucun doute le *Phytophthora infestans* causant le mildiou de la pomme de terre et de la tomate. Parmi les espèces causant des pourritures au niveau des racines, on retrouve *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora fragariae* et *Phytophthora megasperma*. Les plantes les plus susceptibles à la pourriture phytophthoréenne des racines sont les arbres fruitiers, les arbres forestiers, les plantes annuelles et ornementales et les fraisiers (Agrios, 1988).

C'est en 1937 que le *Phytophthora* fut identifié comme étant l'agent responsable du pourridié des racines de framboisier en Écosse; l'espèce isolée a été identifiée comme étant *Phytophthora citricola* (Waterson, 1937). L'espèce *Phytophthora fragariae* fut isolée par McKeen (1958) de racines de ronces-framboises (“loganberry”). Il observa la présence d'un champignon semblable chez les framboisiers mais il ne put l'obtenir en culture pure. En Amérique, le pourridié des racines du framboisier fut diagnostiqué pour la première fois en 1965 (Converse et Schwartze, 1965). Converse et Schwartze (1968) identifièrent *Phytophthora erythroseptica* comme étant l'espèce responsable du pourridié des racines de

framboisier dans l'état de Washington aux États-Unis. À la fin des années 1980, la pourriture des racines du framboisier a été beaucoup plus souvent associée au *Phytophthora*. Ainsi, le *Phytophthora erythroseptica* fut isolé de plants de framboisiers en Allemagne (Seemüller et al., 1986) et le *Phytophthora fragariae* de plants de framboisiers en France (Nourrisseau et Baudry, 1987). En Grande-Bretagne, Duncan et al. (1987) isolèrent, du framboisier, cinq espèces de *Phytophthora* (*Phytophthora syringae*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cambivora* et *Phytophthora megasperma*). Parmi ces espèces, *Phytophthora megasperma* était l'espèce causant les symptômes les plus graves chez les framboisiers. En Australie, Washington (1988) identifia le *Phytophthora cryptogea* comme l'agent responsable du pourridié chez le framboisier. Aux États-Unis, dans l'état de New York, sept espèces de *Phytophthora* (*Phytophthora fragariae*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora citricola* et deux autres espèces non identifiées) furent isolées par Wilcox en 1989. Les travaux précédemment cités suggéraient que plusieurs espèces de *Phytophthora* pouvaient être responsables de la maladie, mais ceci semble plutôt résulter d'une mauvaise interprétation des tests d'identification taxonomique des organismes du genre *Phytophthora*. En effet, Duncan et al. (1991) démontrèrent que la majorité des souches isolées dans les études précédentes appartenaient à la même espèce, soit *Phytophthora fragariae*. Comme l'apparence des colonies sur agar, la vitesse de croissance, la morphologie de leurs spores et le patron d'électrophorèse des protéines de la plupart des souches étaient semblables, ceci suggérait cette hypothèse. Récemment, des études génétiques viennent également étayer l'hypothèse que le principal agent du pourridié des racines de framboisier est le *Phytophthora fragariae* (Garand et al., 1994). Le *Phytophthora fragariae* est habituellement associé à une maladie du fraisier, la stèle rouge. Les souches qui attaquent le fraisier ne peuvent se différencier morphologiquement ou physiologiquement des souches attaquant le framboisier. Cependant, les souches attaquant le fraisier ne sont pas virulentes sur framboisier et inversement, les souches attaquant le framboisier ne sont pas virulentes sur le fraisier. Les souches virulentes sur fraisier ont sur la

base de leur pouvoir pathogène été classées sur la base de la sous-espèce *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* alors que celles attaquant le framboisier ont été classées dans la sous-espèce *Phytophthora fragariae* var. *rubi*.

Au Québec, c'est en 1989 que le pourridié fut détecté pour la première fois. En 1991, déjà plus de 50% des framboiseraies de l'Estrie et de la Beauce étaient atteintes de la maladie (Breton, 1991). Le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* cause le pourridié des racines du framboisier lorsque le sol est très humide et que la température se situe entre 15 et 23°C. Chez les plants de framboisiers atteints de pourridié, on observe la mort des radicelles et des grosses lésions brunes sont présentes chez les plus grosses racines (Thibodeau, 1991). On observe aussi des nécroses et des chloroses marquées sur les feuilles ainsi qu'un flétrissement général des tiges. Chez les jeunes plants, tout le système racinaire peut être atteint, la plante mourra donc rapidement. Chez les framboisiers matures, le pourridié des racines entraîne une diminution de la production et de la grosseur des fruits. Les symptômes peuvent varier selon la souche de *Phytophthora* infectant le plant. Certaines souches considérées comme étant très agressives causeront la pourriture des racines sur 46 à 96% des plants inoculés et 80% des plants infectés mourront (Wilcox, 1989).

Le *Phytophthora* peut survivre pour une période d'au moins cinq ans dans le sol sous forme d'oospores. Les oospores sont les spores de reproduction sexuée de l'agent pathogène. Ces spores de résistance sont formées dans les racines infectées. Elles germent en présence d'eau et, à des températures se situant entre 5 et 15°C, elles forment des sporanges, les organes de reproduction asexuée (Aber et Drouin, 1993). Les sporanges libèrent ensuite des zoospores, petites spores mobiles, qui se déplacent dans l'eau vers des racines saines. La production de zoospores est maximale entre 10 et 20°C. L'eau est essentielle à la dissémination des zoospores. Les zoospores qui sont entraînées par l'eau de ruissellement ou de drainage, peuvent ainsi contaminer rapidement des plants situés à plusieurs centaines de mètres du foyer

initial d'infection. Lorsqu'elles rencontrent une racine, les zoospores s'y attachent, s'enkystent ou germent en mycélium, ce qui cause de nouvelles infections (Fry et al., 1993). Le mycélium, en croissant à l'intérieur des racines, va provoquer un blocage des vaisseaux d'où la pourriture des racines et le flétrissement des parties aériennes du framboisier. Au Québec, c'est au printemps et à l'automne, alors que la température et l'humidité sont idéales, que le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* cause de nouvelles infections.

Pour réduire les infections de pourridié des racines de framboisier, il faut dans un premier temps faire de la lutte préventive. Il est recommandé aux producteurs d'utiliser seulement des plants certifiés, de planter les plants de framboisiers dans un sol naturellement bien drainé, de choisir un terrain où l'on n'a pas cultivé de framboisier dans les cinq dernières années, d'éviter le transport de matériel et de machineries agricoles non désinfectés d'un champ contaminé vers un champ non-contaminé et d'éviter d'irriguer la culture à partir d'un bassin recevant l'eau de drainage de champs contaminés (Thibodeau, 1991). De plus, la culture des framboisiers sur butte contribuerait à diminuer significativement l'indice du pourridié (Heiberg, 1995), vraisemblablement en favorisant un meilleur écoulement des eaux.

Présentement, au Canada, un seul produit est homologué pour lutter contre le *Phytophthora fragariae* var. *rubi*: le métalaxyl (Ridomyl 240EC). Ce produit agit sur le *Phytophthora* en diminuant le taux de germination des sporanges (Bruck et al., 1980). Le métalaxyl est un produit fongistatique et non un fongicide à l'égard du *Phytophthora*. Le champignon n'est donc pas tué par ce produit, mais sa propagation est ralentie. Il faut donc répéter les traitements de métalaxyl régulièrement. Cela devient dispendieux pour le producteur et nocif pour l'environnement. De plus, l'utilisation répétée de fongicides ou de produits fongistatiques peut amener certains effets secondaires comme la sélection d'une population résistante à ces produits. Il a d'ailleurs été démontré que le *Phytophthora fragariae* pouvait développer une résistance contre le métalaxyl (Nickerson, 1990).

Un moyen intéressant pour lutter contre un organisme phytopathogène tout en diminuant ou en évitant l'utilisation de fongicides ou de produits fongistatiques, c'est la lutte biologique. La lutte biologique consiste à combattre une maladie causée par un organisme au moyen d'un autre organisme. Dans ce travail, c'est cette définition que nous utiliserons. Une autre définition plus large de la lutte biologique est parfois utilisée :

“Toute action mettant en jeu des organismes ou modifiant l'hôte, y compris les méthodes culturales, qui permettent de diminuer, par voie directe ou indirecte, les dommages causés par un parasite.” (Corbaz, 1990).

La lutte biologique connaît ces dernières années un regain de popularité dû en partie à un certain échec de la lutte chimique. Les traitements chimiques tels que les fongicides donnent de bons résultats à court terme mais à long terme, leur accumulation ou l'accumulation de leurs résidus dans l'environnement représente un danger qu'on ne peut plus négliger. Par contre, la lutte biologique a une efficacité relative et demande plus de connaissances et d'observations, mais à long terme, elle est beaucoup plus intéressante sur le plan environnemental et économique (Corbaz, 1990).

Pour qu'un microorganisme antagoniste soit efficace pour lutter contre un agent pathogène, il lui faut posséder certains mécanismes d'antagonisme. Les mécanismes les plus étudiés sont l'hyperparasitisme, l'occupation de la niche écologique et l'antibiose.

L'hyperparasitisme implique l'invasion des cellules de l'agent pathogène par le microorganisme antagoniste (Corbaz, 1990). L'agent antagoniste utilisera des enzymes lytiques tels que des glucanases, des chitinases et des lysozymes pour dégrader les parois de l'agent pathogène. Par exemple, il a été démontré que les hyphes de l'agent pathogène *Rhizoctonia solani* et les spores de l'agent pathogène *Cochliobolus* sp. peuvent être perforées

dans le sol par des myxobactéries du genre *Polyangium* et des amibes vampyrellides ce qui entraîne une diminution de la population des agents pathogènes (Homma, 1984).

En occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène, un microorganisme peut compétitionner avec l'agent pathogène au niveau de l'espace et des nutriments, ce qui peut diminuer ou même empêcher la croissance de l'agent pathogène. Par exemple, certaines bactéries produisant des sidérophores ont un avantage écologique. Les sidérophores de ces microorganismes captent le fer, pouvant le rendre ainsi non disponible pour l'agent pathogène ce qui conséquemment limite sa croissance. Ce mécanisme est souvent attribué aux agents antagonistes de l'espèce *Pseudomonas fluorescens* (Corbaz, 1990). Des sidérophores produits par une souche de *Pseudomonas fluorescens* formeraient un complexe avec les métaux du sol et les rendraient non disponibles pour les autres microorganismes de son environnement dont le *Pythium ultimum* causant la fonte des semis (Howell et Stipanovic, 1980). Aussi, le microorganisme antagoniste peut consister en une souche avirulente occupant la même niche écologique qu'un agent pathogène. Ces souches avirulentes peuvent libérer des éliciteurs, des substances mettant en branle les mécanismes de défense de la plante. Celle-ci produira alors des phytoalexines et des protéines PR qui lui confèrent une résistance systémique. Par exemple, en introduisant au niveau de la rhizosphère de la fève de soya une souche non compatible de *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinae*, la quantité de phytoalexines produite augmente induisant un accroissement de la résistance de la plante face aux agents pathogènes (Agrios, 1988).

L'antibiose consiste en la production par l'agent antagoniste d'antibiotiques efficaces contre l'agent pathogène (Corbaz, 1990). Ces antibiotiques vont ralentir ou arrêter la croissance de l'agent pathogène en inhibant divers mécanismes cellulaires tels que la synthèse des parois, de l'ADN, de l'ARN ou des protéines. La fonte des semis du coton due à *Pythium ultimum* peut être combattue par un enrobage des semences avec la souche Pf 5 de *Pseudomonas*

fluorescens. Cette souche produit un antibiotique, la polyulutérine. La fonte des semis est ainsi réduite de façon significative aussi bien par l'utilisation de ce *Pseudomonas* comme agent d'enrobage que par l'utilisation de l'antibiotique purifié (Howell et Stipanovic, 1980).

Il n'existe présentement aucun moyen de lutte biologique pour contrer le pourridié des racines de framboisier. L'ultime but de notre programme de recherche vise donc à établir un moyen de lutte biologique contre le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* à l'aide d'actinomycètes. Les actinomycètes sont reconnus pour leur production de métabolites secondaires et d'enzymes extracellulaires, des produits pouvant être intéressants dans les mécanismes d'antibiose et d'hyperparasitisme (Lahdenperä et al., 1991).

Dans un travail précédent effectué par Diane Valois (1994) de notre laboratoire, 13 souches d'actinomycètes ont été sélectionnées pour leur production d'enzymes extracellulaires dégradant la paroi de glucanes du *Phytophthora* ainsi que pour leur production de métabolites secondaires inhibant la croissance du champignon (Valois et al., 1996). Onze de ces 13 souches diminuent significativement l'indice du pourridié des racines lorsqu'inoculées sur de jeunes plants de framboisiers infectés avec le *Phytophthora* (Valois et al., 1996). Ces essais ont été faits dans des sols qui avaient été stérilisés avant l'ajout des actinomycètes antagonistes et du *Phytophthora*. La compétitivité des actinomycètes antagonistes envers d'autres microorganismes du sol n'a donc toujours pas été évaluée.

Une caractérisation des enzymes extracellulaires produits par les 13 souches d'actinomycètes a déjà été amorcée. La paroi cellulaire du *Phytophthora* et des oomycètes en général est composée de glucanes, contrairement aux parois des autres champignons dont la paroi est constituée principalement de chitine. Plus spécifiquement, la paroi cellulaire du *Phytophthora* est composée principalement de β -glucanes et ce, presque à toutes les étapes de son cycle vital (kyste, mycélium, sporange, chlamydospore, gamétange et oospore). La seule étape du cycle

vital où l'on ne retrouve pas de β -glucanes dans la paroi du *Phytophthora* est celle des zoospores (Bartnicki-Garcia et Wang, 1987). Les β -glucanes représentent 80 à 90% du poids sec de la paroi du mycélium et ils sont constitués de deux fractions : une fraction cellulosique (chaînes de glucoses liés entre eux par des liens β -1,4) et une fraction non-cellulosique qui est beaucoup plus abondante. La partie non-cellulosique comporte des chaînes de D-glucoses liés entre eux par des liens β -1,3 et des chaînes latérales de β -1,3 glucanes qui sont attachées à la chaîne principale par des embranchements β -1,6 (Bartnicki-Garcia et Wang, 1987). Les 13 souches d'actinomycètes antagonistes produisent des β -1,3, des β -1,4, et des β -1,6-glucanases lorsqu'elles croissent sur des milieux contenant respectivement de la laminarine, du cellulose et du pustulane comme source de carbone. Les glucanases sécrétées par les actinomycètes antagonistes peuvent donc efficacement dégrader les glucanes des parois du mycélium de *Phytophthora*. On peut d'ailleurs l'observer par la production d'une zone d'éclaircissement autour des colonies d'actinomycètes antagonistes croissant sur un milieu solide contenant du mycélium fragmenté de *Phytophthora* (Valois et al., 1996). De plus, les souches antagonistes ont également démontré une activité lytique sur le mycélium vivant de *Phytophthora* (Valois et al., 1996). Par contre, il n'a pas été formellement démontré que les glucanases produites par les souches antagonistes avaient un rôle dans la réduction des symptômes du pourridié.

Dans ce projet, nous nous attarderons aux mécanismes d'antibiose des actinomycètes antagonistes au *Phytophthora*. Les antibiotiques produits par les actinomycètes antagonistes pourraient contribuer significativement à la réduction du pourridié observée lorsque les actinomycètes sont inoculés sur des plants de framboisiers mis en présence de *Phytophthora* que ce soit ou non de façon synergique avec les glucanases. Certains travaux de recherche viennent étayer l'hypothèse que les antibiotiques sont importants dans la lutte biologique. Par exemple, il a été démontré que jusqu'à 40% des actinomycètes isolés du sol peuvent inhiber la croissance de champignons terrioles par production d'antibiotiques (Broadbent et al., 1971). De plus, certaines souches d'actinomycète démontrent une grande efficacité à inhiber

la croissance des oomycètes *in vitro* (Knauss, 1976). Des expériences en serre ont montré que des souches d'actinomycètes protègent les plantules de laitue contre la fonte des semis causée par le *Pythium ultimum*, un champignon de la classe des oomycètes. Une de ces souches, *Streptomyces lydicus* WYEC108 a été caractérisée. Cette souche de *Streptomyces* est capable de détruire les oospores en germination et de causer des dommages à la paroi cellulaire des hyphes du champignon par la production de métabolites extracellulaires antifongiques (Crawford et al., 1993; Walter et Crawford, 1995). Un autre exemple est la souche *Streptomyces violaceoniger* A50 qui produit dans son surnageant de culture un antibiotique inhibant le *Phytophthora capsici*. L'antibiotique, extrait à l'aide du butanol, diminue significativement la rouille du poivron causée par le *Phytophthora capsici* (Hwang et al., 1994). Il a aussi été démontré que *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*, un actinomycète produisant un antibiotique, la geldanamycine, contribue à diminuer l'indice de la pourriture des racines des fèves de soya causé par le *Phytophthora megasperma* var. *sojae* (Rothrock et Gottlieb, 1981). Un produit commercial à base d'actinomycètes est déjà disponible en Europe. Ce biofongicide contenant des cellules vivantes de *Streptomyces griseoviridis* a été baptisé Mycostop. Introduit dans le sol, le microorganisme du biofongicide sécréterait des substances antibiotiques qui inhiberaient plusieurs champignons pathogènes dont les oomycètes. Des résultats plus que satisfaisants dans des cultures en serre et aux champs contre plusieurs agents pathogènes dont le *Pythium* sp. ont été obtenus avec Mycostop. En effet, la fonte des semis du poivron est diminuée de plus de 50% lorsque les semis sont traités avec 5 g du biofongicide Mycostop par kg de semence (Lahdenperä et al., 1991).

Le but de mon projet est d'amorcer l'étude des mécanismes d'antibiose des souches d'actinomycètes antagonistes au *Phytophthora* sélectionnées précédemment (Valois, 1994). Plus spécifiquement, nous vérifierons le spectre d'inhibition des antibiotiques produits par les 13 souches d'actinomycètes antagonistes au *Phytophthora*. Deux des souches les plus

prometteuses dans les précédents essais sur plantes (Valois, 1994), les souches EF14 et EF76, seront analysées pour leur capacité à diminuer l'indice du pourridié sur des plants de framboisiers certifiés qui ont poussé en sol non stérile. Finalement, l'identité chimique de l'antibiotique produit par la souche EF76 sera déterminée par spectre de masse et résonance magnétique nucléaire.

CHAPITRE 1

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1 Souches de microorganismes et milieux de culture utilisés.

Les souches bactériennes, les souches de *Phytophthora* et les autres espèces de champignons utilisées dans cette étude sont énumérées au tableau 1.

Les souches de *Phytophthora* étaient cultivées sur le milieu V8A (354 ml/l de jus V8 Campbell; 5 g/l de CaCO_3 ; 15 g/l d'agar Difco) (Ribeiro, 1978) pour les ensemencements de routine. Pour la conservation à long terme des souches de *Phytophthora* ainsi que pour la culture des autres souches de champignons, le milieu PDA de Difco était utilisé.

Les actinomycètes étaient maintenus sur milieu solide YME (4 g/l de glucose; 4g/l d'extrait de levure; 10 g/l d'extrait de malt et 20 g/l d'agar) (Pridham et al., 1956, 1957). Pour la production de spores, les actinomycètes étaient cultivés sur le milieu SLM3 (10 g/l d'amidon; 5 g/l de liqueur de maïs ; 3 g/l de CaCO_3 ; 22 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ et 20 g/l d'agar Difco) (Dewitt, 1985).

Le milieu YGM+ liquide (4 g/l d'extrait de levure; 5 g/l de glucose; 0,25 g/l de K_2HPO_4 ; 0,25 g/l de KH_2PO_4 ; 0,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 50 mg/l de NaCl et 9 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (King et al., 1991) était utilisé pour la production d'antibiotiques par les actinomycètes ainsi que pour la production de l'inoculum destiné aux tests sur les plants de framboisiers certifiés .

Les bactéries autres que les actinomycètes étaient cultivées sur milieu NA de Difco.

Tableau 1. Microorganismes utilisés dans cette étude.

Microorganisme	Souche	Source
Actinomycètes	EF14, EF22, EF25, EF27, EF34, EF43, EF72, EF76, EF97	Faucher <i>et al.</i> (1992)
	N106	Dupuy (1992)
	DVD1, DVD3, DVD4	Valois (1994)
Autres bactéries	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> var. <i>anitratus</i> CH2	Collection du département de Biologie, Université de Sherbrooke.
	<i>Bacillus cereus</i> C4	
	<i>Citrobacter freundii</i> CH64	
	<i>Enterobacter aerogenes</i> A20 (API 75_1193)	
	<i>Escherichia coli</i> B C52 (wild type, ATCC23848)	
	<i>Klebsiella oxytoca</i> C97 (ATCC 43863)	
	<i>Proteus vulgaris</i> C88 (ATCC 13315)	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> C29 (ATCC 13525)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> C101	
	<i>Streptococcus faecalis</i> C60	
Souches de <i>Phytophthora</i>	<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3	M. Lacroix ¹
	<i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> 390	R. Hogue ¹
Autres espèces de champignon	<i>Aspergillus niger</i>	Collection du département de biologie, Université de Sherbrooke.
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	
	<i>Penicillium italicum</i>	
	<i>Phycomyces blakesleeana</i>	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	
	<i>Sclerotinia</i> sp.	
	<i>Rhizoctonia solani</i>	
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	
	<i>Pythium</i> sp. 1416	M. Lacroix ¹
	<i>Pythium</i> sp. 2367	
	<i>Pythium ultimum</i> 447	

¹ Service de phytotechnie de Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.

1.2 Inhibition de croissance de diverses espèces de champignons et de bactéries par les 13 souches d'actinomycètes antagonistes.

Chacune des 13 souches d'actinomycètes a été testée pour sa capacité à inhiber la croissance de tous les champignons énumérés au tableau 1 sauf ceux du genre *Phytophthora* qui avaient été préalablement analysés par Valois et al. (1996). Pour ce faire, les actinomycètes ont été inoculés en un disque de 1 cm de diamètre dans une boîte de pétri contenant le milieu PDA et leur croissance s'est poursuivie pendant 48 heures à 30°C. À ce moment, les champignons ont été inoculés à proximité des actinomycètes. Pour tous les champignons, exceptés les levures, un implant d'agar d'un diamètre de 8 mm portant une culture de champignon vieille de 5 jours a été déposé à une distance de 1 cm de l'actinomycète. Les levures, *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces octosporus*, ont été inoculées dans un agar de surface. Pour ce faire, une bouclée de chacune des levures a étéensemencée dans du PDA à 0,7% refroidi mais encore liquide. Le milieu inoculé a alors été versé dans les pétris où étaitensemencé l'actinomycète. L'inhibition de croissance des champignons y compris les levures pouvait être vérifiée par la présence d'une zone claire autour des colonies d'actinomycètes.

Les 13 souches d'actinomycètes ont aussi été testées pour leur capacité à inhiber la croissance des diverses espèces bactériennes énumérées au tableau 1. Ces essais ont été effectués de la même façon que lors des tests d'inhibition de croissance des levures à l'exception que le milieu NA était utilisé au lieu du milieu PDA.

1.3 Pouvoir d'inhibition de croissance des surnageants de culture des actinomycètes sur le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3.

Les surnageants de culture des 13 souches d'actinomycète ont été testés pour leur pouvoir d'inhibition de croissance envers le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3. Pour ce faire, les 13 souches d'actinomycètes croissaient dans le milieu de culture liquide YGM+. Après cinq jours de croissance, 2 ml de chacun des surnageants de culture ont été récoltés et stérilisés avec un filtre millipore (0,22 µm). Les échantillons ont ensuite été évaporés à l'aide d'un évaporateur "Speed vac concentrator" de Savant instrument inc. (modèle RH 40-12) pour concentrer d'environ 20 fois les produits dissous. Chacun des échantillons concentrés a été disposé sur un papier filtre Schleicher & Shuell #740-E d'un diamètre de 13 mm. Ces filtres ont ensuite été déposés sur un pétri contenant du milieu V8 à une distance de 1 cm d'un implant d'agar provenant d'une culture sur un agar V8 de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 vieille de 5 à 7 jours. Après une période de 48 heures, l'inhibition de croissance par les surnageants du culture des actinomycètes sur le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 était vérifiée.

Pour la souche de *Streptomyces* sp. EF76, ce test n'a pas seulement été effectué avec le surnageant de culture vieux de 5 jours, mais il a été fait à chaque jour pendant une période de 8 jours.

1.4 Extraction de l'antibiotique produit par la souche de *Streptomyces* sp. EF76.

Le surnageant de culture de la souche de *Streptomyces* sp. EF76 a été extrait avec différents solvants pour en retirer le produit antibiotique inhibant la croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3. La souche de *Streptomyces* sp. EF76 a été incubée dans 1 litre de

milieu YGM+ pendant une période de 72 heures. La culture a ensuite été passée sur filtre Whatman #1 d'un diamètre de 150 mm. Le filtrat a été récupéré et transvidé dans une ampoule à décantation de 2 litres. Selon une méthode couramment utilisée en chimie organique, trois extractions consécutives ont été faites avec 300 ml d'hexane, un solvant peu polaire. L'hexane des trois extractions a été récupéré, combiné et évaporé dans un évaporateur Büchi Rotavapor R-114, pour constituer la fraction hexane. Le filtrat ayant déjà subi trois extractions avec de l'hexane a été soumis à trois extractions consécutives avec 300 ml de chloroforme, un solvant plus polaire. Le chloroforme des trois extractions a été récupéré, combiné et évaporé pour constituer la fraction chloroforme. Le filtrat ayant subi des extractions à l'hexane et au chloroforme a enfin été extrait trois fois avec 300 ml d'acétate d'éthyle, solvant le plus polaire. L'acétate d'éthyle des trois extractions a été récupéré, combiné et évaporé pour constituer la fraction acétate d'éthyle. Un échantillon (20 ml) du filtrat de départ ainsi que des échantillons (20 ml) du filtrat récupéré après chaque extraction (hexane, chloroforme et acétate d'éthyle) ont été évaporés dans un évaporateur Büchi Rotavapor R-114. Des quantités de 1 à 2 mg des produits des fractions hexane, chloroforme et acétate d'éthyle et des produits des filtrats ont été dissous dans leur solvant respectif (hexane, chloroforme, acétate d'éthyle ou eau). Ces produits ont alors été déposés sur des papiers filtres Schleider & Shuell #740-E d'un diamètre de 13 mm. Ensuite, chaque filtre a été séché et déposé à 1 cm d'un implant d'agar de 8 mm de diamètreensemencé avec *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 provenant d'une culture de 5 à 7 jours sur V8. Des filtres témoins traités avec chaque solvant ont été ajoutés au test pour vérifier que l'inhibition ne provenait pas des solvants. L'inhibition de croissance était vérifiée après une période de 48 à 72 heures.

1.5 Isolement de l'antibiotique produit par *Streptomyces* sp. EF76 et *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55 256.

L'isolement du produit inhibant la croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 dans les surnageants de culture des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 a été fait par CCM. Pour ce faire, les souches de *Streptomyces* sp. EF76 et de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 ont poussé dans 1 litre de milieu de culture YGM+ pendant une période de 72 heures. Les cultures ont été filtrées sur un papier filtre Whatman #1 d'un diamètre de 150 mm. Trois extractions consécutives avec 300 ml de chloroforme ont été faites sur les filtrats de culture. La fraction chloroforme obtenue a été évaporée à l'aide d'un évaporateur Büchi Rotavapor R-114. Les produits extraits ont été dissous dans du dichlorométhane à une concentration de 40 mg/ml et déposés sur des plaques de silice (Silica gel 60 F₂₅₄, 20x20 cm, 0,5 mm d'épaisseur, EM Separation Technology) à raison de 20 mg par plaque. Les produits extraits ont ainsi été séparés par CCM dans un solvant chloroforme : méthanol ; 95 : 5. Après la migration, les plaques de silice ont été divisées horizontalement en six parties nommées A, B, C, D, E et F. Les parties correspondaient aux Rf suivants : A: 0,74 à 1 ; B: 0,54 à 0,74 ; C 0,48 à 0,54 ; D: 0,27 à 0,48 ; E: 0,09 à 0,27 et F: 0 à 0,09. Les produits de chacune de ces parties (A à F) ont été élués des plaques de silice de la façon suivante: la silice a été grattée de la plaque à l'aide d'une lame de rasoir et ensuite les produits ont été extraits de la silice à l'aide d'un solvant chloroforme : méthanol (80 : 20). Le mélange de silice et de solvants a ensuite été passé sur un filtre de verre (ASTM 10-15 M, Pyrex). Le même procédé que celui décrit à la section 1.4 a été utilisé pour vérifier si les produits provenant des parties A à F de la CCM inhibaient la croissance du *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3.

1.6 Identification de l'antibiotique produit par *Streptomyces* sp. EF76.

1.6.1 Spectre de masse de l'antibiotique produit par les souche de *Streptomyces* sp. EF76 et de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256.

Le produit jaune de la partie C (efficace dans l'inhibition de croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3) de la chromatographie sur couche mince a été analysé en spectroscopie de masse à l'aide d'un spectromètre de masse ZAB-1F de la compagnie VG Mass Spectrometer. Quelques microgrammes de produit ont été nécessaires pour l'obtention du spectre de masse.

1.6.2 Spectre de résonance magnétique nucléaire de l'antibiotique produit par les souches de *Streptomyces* sp. EF76 et de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256.

Le produit jaune de la partie C (efficace dans l'inhibition de croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3) de la chromatographie sur couche mince a été analysé en résonance magnétique nucléaire (RMN) à l'aide d'un spectromètre Brüker AC-300 (300,13 Mhz pour ^1H). Pour ce faire, 6 à 8 mg de produit purifié ont été dissous dans un volume de 2 ml de chloroforme deutérié et la solution a été déposée dans un tube de verre pour RMN avant d'être soumis à l'analyse.

1.7 Extraction de l'ADN génomique des souches de *Streptomyces*.

L'ADN génomique des *Streptomyces* a été isolé selon la procédure 3 de Hopwood et al. (1985). L'ADN de *Streptomyces scabies* EF46 et de *Streptomyces caviscabies* EF104 a été gracieusement fourni par Claudia Goyer de l'Université de Sherbrooke.

1.8 Hybridation entre l'ADN de la souche *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 et l'ADN des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et de *Streptomyces scabies* EF46.

Pour vérifier l'identité taxonomique de la souche de *Streptomyces* sp. EF76, nous avons procédé à des expériences d'hybridation ADN-ADN. L'ADN génomique de chacune des souches à comparer a été dissous à une concentration de 400 ng/ml d'eau stérile et a ensuite été fragmenté à l'aide de la presse de French (pression cellulaire de 800 lbs/pc²; American Instrument Company). L'ADN fragmenté de la souche de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 a été marqué au dCTP tritié en utilisant l'ensemble ³²P-QuickPrime Kit de la compagnie Pharmacia Biotech selon les recommandations du fabricant. Les hybridations ADN-ADN ont été faites selon la méthode de Stall et al. (1994) comme modifiée par Paradis et al. (1994). L'ADN marqué de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 a été hybridé avec l'ADN des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et de *Streptomyces scabies* EF46.

1.9 Digestion de l'ADN génomique des souches de *Streptomyces* sp. EF76, de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 et de *Streptomyces caviscabies* EF104.

Les patrons de digestion de l'ADN génomique de la souche de *Streptomyces* sp. EF76 ont été comparés à ceux des souches de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 et de *Streptomyces caviscabies* EF104. Les digestions des ADNs génomiques (2,5 µg d'ADN/µl d'eau) ont été faites à l'aide des enzymes de restriction *Pvu*II (12 Unités) et *Bgl*II (6 Unités) à 37°C pour une période de 90 minutes. Après la digestion, l'ADN a été chargé sur

un gel d'agarose à 0,8% et soumis à l'électrophorèse. La migration s'est faite à 75 millivolts pour une période d'environ 2 heures. Les gels ont été photographiés sous UV après coloration au bromure d'éthidium (0,5 µg/ml).

1.10 Effet des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et EF14 sur l'indice du pourridié des racines de framboisier.

La capacité des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et EF14 à diminuer le pourridié des racines de framboisier a été testée en terreau non stérile et artificiellement contaminé avec deux souches de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* (F3 et 390). Pour cette expérience, des plants de framboisiers certifiés de la variété Héritage ont été utilisés. Un litre du culture de milieu YGM+ a étéensemencé avec la souche de *Streptomyces* sp. EF76 ou la souche EF14, puis incubé pour une période de 72 heures afin de produire l'inoculum des souches antagonistes. Les racines de 15 plants de framboisiers ont alors été trempées dans la culture de EF76 ou dans la culture de EF14 alors que les racines de 10 autres plants ont été trempées dans du milieu YGM+ non inoculé. Après le trempage des racines dans le milieu YGM+ inoculé ou non inoculé, les framboisiers ont été plantés dans du terreau et ont été maintenus 15 jours dans une chambre de croissance (20°C, période d'éclairage de 16 heures) avant d'être infectés avec deux souches de *Phytophthora*. Le *Phytophthora* a été introduit dans le sol de la façon suivante : un implant d'agar d'un diamètre de 10 mm portant une culture vieille de 5 jours de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 et un implant portant la souche de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* 390 ont été déposés dans 10 pots au niveau des racines de plants inoculés avec le *Streptomyces* sp. EF76 ou le *Streptomyces* sp. EF14 et dans 10 pots de plants non inoculés. Après l'inoculation avec le *Phytophthora*, la température de la chambre de croissance était réduite à 15°C afin de favoriser l'infection par les souches de *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. Les symptômes ont été notés trois mois après l'inoculation du *Phytophthora* et un indice de pourridié a été associé à chaque plant. Une cote de 0 à 5 était

attribuée aux plants selon la gravité de leurs symptômes. La cote 0 représentait un framboisier parfaitement sain et la cote 5 représentait un framboisier mort (Malajczuk, 1983). Le tableau 2 résume les différents traitements effectués.

Tableau 2. Traitement des plants de framboisiers certifiés.

Traitement	Nombre de plants traités
Inoculation avec <i>Streptomyces</i> sp. EF76	5
Inoculation avec <i>Streptomyces</i> sp. EF14	5
Inoculation avec <i>Streptomyces</i> sp. EF76 et <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3 et 390	10
Inoculation avec <i>Streptomyces</i> sp. EF14 et <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3 et 390	10
Inoculation avec <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3 et 390	10
Pas d'inoculation	10

CHAPITRE 2

RÉSULTATS

2.1 Inhibition de croissance de diverses espèces microbiennes par les souches d'actinomycètes antagonistes.

2.1.1 Inhibition de croissance de bactéries par les souches d'actinomycètes antagonistes.

Les 13 souches d'actinomycètes ont été testées pour leur pouvoir d'inhibition de croissance envers diverses bactéries Gram positif et Gram négatif. Les résultats sont présentés au tableau 3. D'après ces résultats, on pouvait diviser les actinomycètes en quatre groupes. Un premier groupe comprenait les souches d'actinomycète DVD1, DVD3, EF22, EF25, EF27, EF34, EF43 et EF97 qui n'inhibaient la croissance d'aucune des espèces de bactéries testées. Un deuxième groupe comprenant les souches d'actinomycètes DVD4 et N106 inhibait seulement la croissance de *Bacillus cereus* et de *Staphylococcus aureus*. Le troisième groupe comprenant la souche d'actinomycète EF14 inhibait seulement la croissance de *Staphylococcus aureus*. Enfin, le quatrième groupe comprenant les souches d'actinomycète EF72 et EF76 inhibait la croissance de toutes les bactéries Gram positif testées. La croissance des bactéries Gram négatif n'a été inhibée par aucune des 13 souches d'actinomycètes.

Tableau 3. Spectre d'inhibition de croissance de 10 espèces bactériennes par les 13 souches d'actinomycètes antagonistes au *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3.

Souches d'actinomycètes	Inhibition de croissance de			
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Proteus vulgaris</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>
DVD1, DVD3, EF22, EF25, EF27, EF34, EF43, EF97	-	-	-	-
DVD4, N106	+	+	-	-
EF14	-	+	-	-
EF72, EF76	+	+	+	-

+ : inhibition de croissance.

- : aucune inhibition de croissance.

2.1.2 Inhibition de croissance d'espèces de champignons par les souches d'actinomycètes antagonistes.

Les 13 souches d'actinomycètes ont été testées pour déterminer leur spectre d'inhibition de croissance envers différentes espèces de champignons. Les souches d'actinomycètes se comportaient très différemment les unes des autres par rapport aux espèces de champignons.

Par exemple, les souches EF14, EF72 et EF76 inhibaient la croissance de tous les champignons testés alors que d'autres souches comme DVD3, N106 et EF25 inhibaient la croissance de quelques espèces de champignons seulement. Cependant, la croissance des trois souches de *Pythium* testées a été inhibée par les 13 souches d'actinomycète. Les résultats détaillés de cette expérience sont présentés au tableau 4.

2.2 Inhibition de croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 par les surnageants de culture d'actinomycètes antagonistes.

Les surnageants concentrés et filtrés provenant de cultures vieilles de cinq jours de chacune des 13 souches d'actinomycètes ont été testés pour leur pouvoir d'inhibition de croissance sur le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3. Seuls les surnageants de culture des souches de *Streptomyces* sp. EF76 (figure 1A) et EF72 inhibaient la croissance du champignon. Les surnageants de culture des souches DVD1, DVD3, DVD4, N106, EF14, EF22, EF25, EF27, EF34, EF43, et EF97 n'inhibaient pas la croissance du *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3.

Pour déterminer le moment idéal pour récupérer l'antibiotique produit par la souche de *Streptomyces* sp. EF76 dans le milieu liquide, le surnageant de culture de *Streptomyces* sp. EF76 a été testé pour son pouvoir d'inhibition de croissance sur le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 sur une période de 8 jours. Le surnageant de la souche de *Streptomyces* sp. EF76 causait une inhibition de croissance du *Phytophthora* à partir du deuxième jour de la culture et ce jusqu'au sixième jour. Le maximum d'inhibition de croissance était observé au 3^e jour.

Tableau 4. Inhibition de croissance de neuf espèces de champignons par les 13 souches d'actinomycètes antagonistes au *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3.

Champignons	Inhibition de croissance des espèces de champignons par les souches										
	DVD1	DVD3	DVD4	N106	EF22	EF25	EF27	EF34	EF43	EF97	EF14 EF72 EF76
<i>Rhizopus stolonifer</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
<i>Phycomyces blakesleeana</i>	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Penicillium chrysogenum</i>	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+
<i>Penicillium italicum</i>	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Sclerotinia</i> sp.	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Schyzosaccharomyces octosporus</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Pythium ultimum</i> 447, <i>Pythium</i> sp. 1416 <i>Pythium</i> sp. 2367	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : inhibition de croissance.

- : aucune inhibition de croissance.

2.3 Extractions du filtrat de culture de la souche de *Streptomyces* sp. EF76 avec différents solvants : effets des fractions obtenues sur la croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi*.

Différentes extractions ont été faites sur le surnageant de culture de la souche de *Streptomyces* sp. EF76 (voir section 1.4) pour vérifier s'il était possible d'isoler dans un autre solvant que l'eau, l'antibiotique produit par *Streptomyces* sp. EF76. De toutes les fractions obtenues, c'était la fraction chloroforme qui causait la plus forte inhibition de croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 (figure 1B). Cependant, d'autres fractions causaient aussi une inhibition de croissance, mais ces inhibitions étaient moins fortes comparées à celle que causait la fraction chloroforme. En effet, le filtrat de départ causait une inhibition de croissance moyenne qui était à peu près égale à celle provoquée par le filtrat de culture ayant subi une extraction à l'hexane. La fraction hexane, la fraction acétate d'éthyle et le filtrat ayant subi des extractions au chloroforme causaient une faible inhibition de croissance du *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3. Pour ce qui est du filtrat ayant subi les extractions à l'hexane, au chloroforme et à l'acétate d'éthyle, il ne causait plus aucune inhibition de croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 (tableau 5).

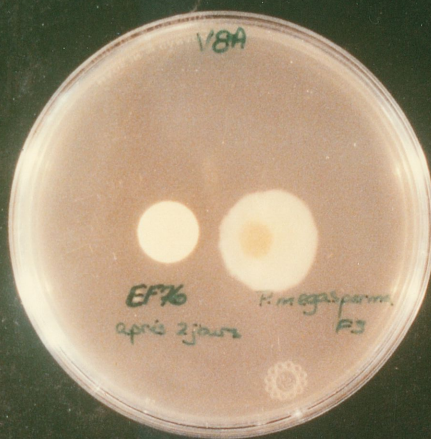
2.4 Inhibition de croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 par les produits de la fraction chloroforme séparés par CCM.

Les produits provenant de la fraction chloroforme des filtrats de culture des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 (voir section 1.5) ont été séparés sur CCM. Seuls les produits dont le R_f se situait entre 0,48 et 0,54 (partie C) inhibaient la croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 (tableau 6). Dans cette partie C, un seul produit était visible et ce produit avait une couleur jaune. Ce produit s'est révélée chimiquement pur et a été caractérisé par RMN et spectre de masse.

Tableau 5. Inhibition de croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 par les différentes fractions obtenues à partir des filtrats de culture de la souche de *Streptomyces* sp. EF76.

Fraction testée	Inhibition de croissance de <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i> F3
Filtrat de culture avant extraction	++
Fraction hexane	+
Filtrat de culture extrait à l'hexane	++
Fraction chloroforme	+++
Filtrat de culture extrait à l'hexane et au chloroforme	+
Fraction acétate d'éthyle	+
Filtrat de culture extrait à l'hexane, au chloroforme et à l'acétate d'éthyle	-
+++ : Très forte inhibition de croissance	
++ : Moyenne inhibition de croissance	
+ : Faible inhibition de croissance	
- : Aucune inhibition de croissance	

(A)



(B)



Inhibition de croissance
de *Phytophthora megasperma* F3
Fraction chloroforme

Figure 1 : Inhibition de croissance du *Phytophthora* (A) par le surnageant de culture filtré et stérilisé de la souche de *Streptomyces* sp. EF76 (B) par la fraction chloroforme des extractions du surnageant de culture de la souche EF76.

Tableau 6. Inhibition de croissance de *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 par les six parties de la fraction chloroforme séparées par CCM.

Partie de la CCM	Rf	Inhibition du <i>Phytophthora fragariae</i> var. <i>rubi</i>
A	0,74 à 1	-
B	0,54 à 0,74	-
C	0,48 à 0,54	+
D	0,27 à 0,48	-
E	0,09 à 0,27	-
F	0 à 0,09	-

+ : inhibition de croissance.

- : aucune inhibition de croissance.

2.5 Spectre de masse et de résonance magnétique nucléaire de l'antibiotique purifié des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256.

Des spectres de masse et de résonance magnétique nucléaire ^1H ont été effectués sur le produit jaune provenant des filtrats de culture des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 et qui a été isolé par CCM (voir section 2.4). Les spectres de masse ainsi que les spectres de résonance magnétique nucléaire ^1H étaient identiques pour le produit jaune des souches EF76 et ATCC 55256. On retrouve les spectres de masse et les spectres de résonance magnétique nucléaire proton aux annexes 1 et 2, respectivement.

Les résultats obtenus par spectre de masse ont permis d'associer la formule moléculaire $C_{28}H_{39}NO_8$ au produit jaune. Cette formule moléculaire a été comparée à celle des autres composés de la banque de structures STM. Vingt-trois composés ayant la même formule moléculaire y ont été trouvés. De ces 23 composés, plusieurs étaient synthétisés en laboratoire et n'étaient pas des produits naturels. D'autres composés ne correspondaient aucunement aux caractéristiques du produit isolé. Enfin, il ne restait que trois choix possibles et de ces choix, un seul produit était synthétisé par un actinomycète et il était dérivé de la geldanamycine. La structure chimique de la geldanamycine ainsi que celle de son dérivé sont présentées à l'annexe 3.

Le produit authentique, la geldanamycine, est déjà décrit dans la littérature et a montré un spectre de résonance magnétique nucléaire identique au produit jaune qui a été isolé (Braodbent et al., 1971). Ces résultats permettent de conclure à l'identité des deux produits et n'obligent pas à redécrire en détails les données spectroscopiques dans le cadre de ce travail. La différence entre les spectres de ces deux produits est due à une trace de solvant ou d'humidité.

2.6 Comparaisons phénotypiques et génétiques entre la souche *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 et la souche de *Streptomyces* sp. EF76.

La geldanamycine est naturellement synthétisée par *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* (DeBoer et al., 1970). Des comparaisons phénotypiques et génétiques ont donc été faites entre les souches de *Streptomyces* sp. EF76 et de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 afin de déterminer si elles appartenaient à la même espèce.

La description phénotypique de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* faite par DeBoer et Dietz (1976), correspondait très bien aux caractéristiques phénotypiques de la souche EF76.

Le mycélium aérien est blanc, le mycélium végétatif est jaune à brun et les spores sont grises. De plus, les spores deviennent noires lorsqu'elles ont atteint la maturité (figure 2).

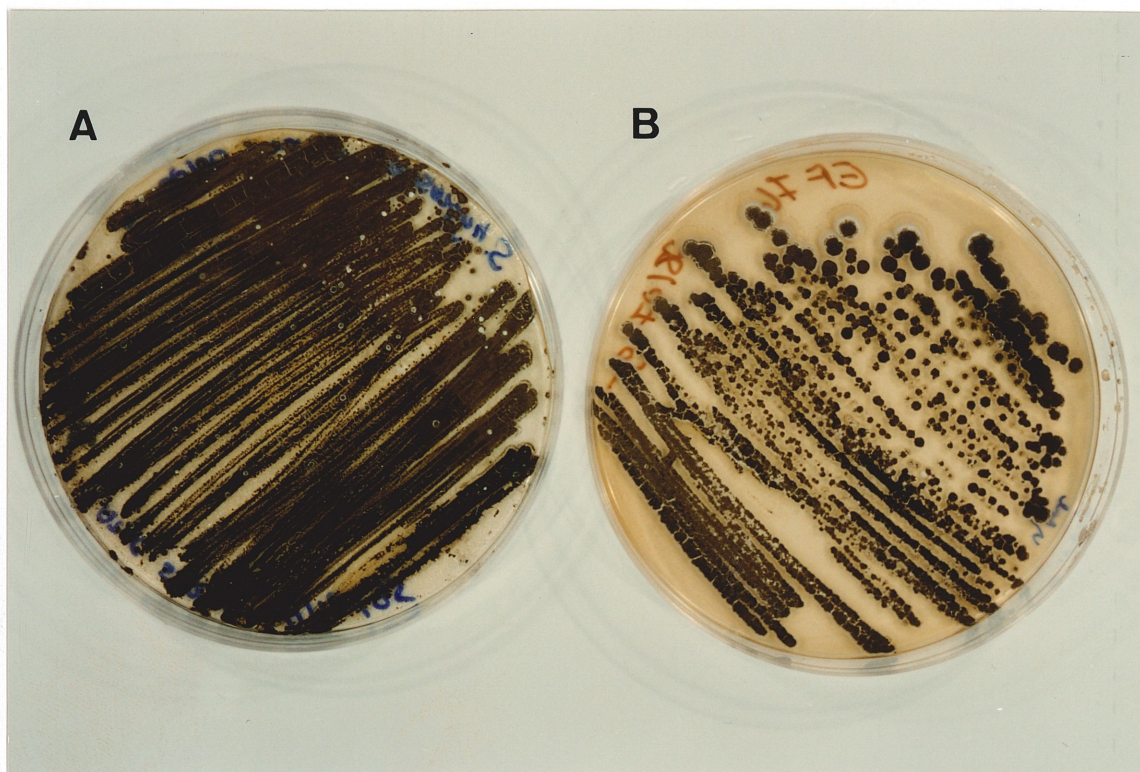


Figure 2 : Culture de (A) *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 et (B) *Streptomyces* sp. EF76 sur milieu YME après 10 jours de croissance. Notez que ces cultures sont recouvertes de spores noires.

Des hybridations ADN-ADN ont été faites entre les génomes de la souche *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256, de la souche de *Streptomyces* sp. EF76 et de la souche *Streptomyces scabies* EF46. Le niveau d'homologie entre les génomes de *Streptomyces* sp. EF76 et de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 était

de 99,9% alors qu'il n'était que de 17,5% entre les génomes de *Streptomyces scabies* EF46 et de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256.

En plus de déterminer le niveau d'homologie entre les génomes des souches EF76 et ATCC 55256, les patrons de digestion de l'ADN génomique de ces souches ont été comparés (voir section 1.9). Pour les souches EF76 et ATCC 55256, les patrons de digestion étaient très semblables, tandis que ceux de la souche de *Streptomyces caviscabies* EF104 différaient considérablement de ceux des deux autres souches. Les résultats sont présentés à la figure 3.

2.7 Effet des souches de *Streptomyces* sp. EF76 et EF14 sur l'indice du pourridié des racines de framboisier.

Deux souches de *Streptomyces* spp., EF76 et EF14, ont été testées pour leur capacité à réduire les effets néfastes causés par *Phytophthora fragariae* var. *rubi* sur des plants de framboisiers certifiés. Nous avons démontré que l'indice du pourridié était significativement réduit lorsque les plants de framboisiers étaient inoculés avec l'une ou l'autre de ces deux souches. L'indice du pourridié qui était de 3,22 lorsque les plants étaient inoculés seulement avec le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* passait à 1,22 lorsque les plants infectés étaient protégés par la souche de *Streptomyces* sp. EF76 et à 0,78 lorsqu'ils l'étaient par la souche de *Streptomyces* sp. EF14. L'effet des souches EF76 et EF14 sur la croissance et la santé des plants de framboisiers a aussi été vérifié en l'absence de *Phytophthora*. Aucune différence significative n'a été notée quant à l'apparence des plants de framboisiers inoculés avec les souches de *Streptomyces* spp. EF76 et EF14 comparativement aux plants non inoculés. Les résultats sont illustrés à la figure 4.

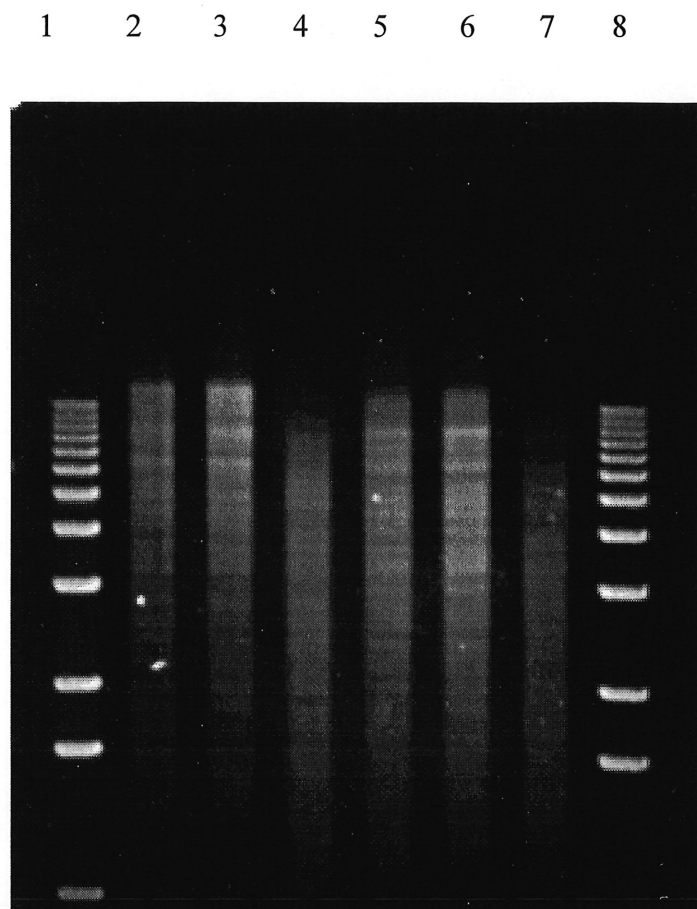


Figure 3: Patron de digestion de l'ADN génomique des souches de *Streptomyces* sp. EF76, *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 et *Streptomyces caviscabies* EF104.

Puits 1 et 8: Marqueur de poids moléculaire (échelle 1 kb)

Puits 2: ADN de *Streptomyces* sp. EF76 digéré avec *Pvu*II

Puits 3: ADN de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55356 digéré avec *Pvu*II

Puits 4: ADN de *Streptomyces caviscabies* EF104 digéré avec *Pvu*II

Puits 5: ADN de *Streptomyces* sp. EF76 digéré avec *Pvu*II et *Bgl*II

Puits 6: ADN de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55356 digéré avec *Pvu*II et *Bgl*II

Puits 7: ADN de *Streptomyces caviscabies* EF104 digéré avec *Pvu*II et *Bgl*II

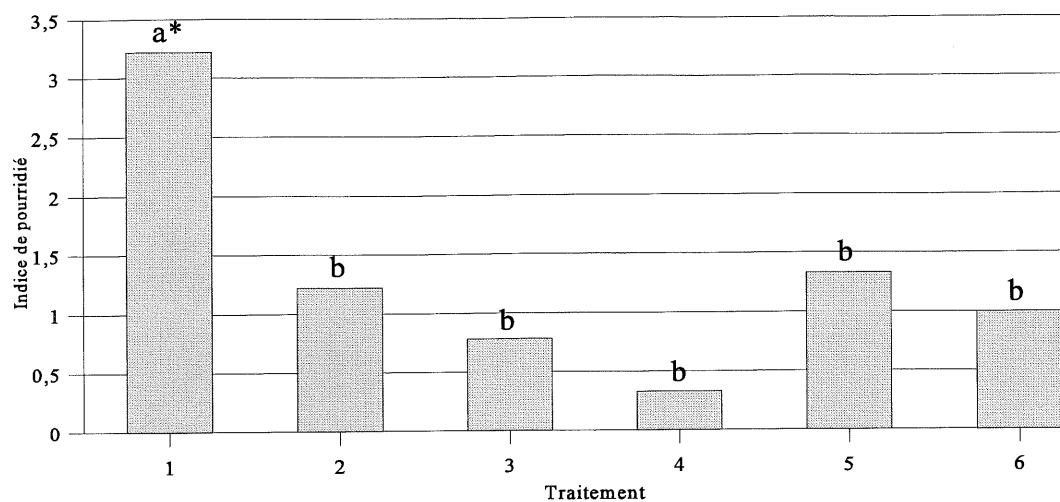


Figure 4: Indice du pourridié des racines du framboisier à la suite de divers traitements.

- 1 : Inoculation avec *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 et 390
- 2 : Inoculation avec *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 et 390 et *Streptomyces* sp. EF76
- 3 : Inoculation avec *Phytophthora fragariae* var. *rubi* F3 et 390 et *Streptomyces* sp. EF14
- 4 : Sans inoculation
- 5 : Inoculation avec *Streptomyces* sp. EF76
- 6 : Inoculation avec *Streptomyces* sp. EF14

*Les résultats représentés par une même lettre ne diffèrent pas significativement (test ANOVA, $p < 0,05$).

CHAPITRE 3

DISCUSSION

Les 13 souches d'actinomycète étudiées dans ce travail avaient été sélectionnées pour leur capacité à lyser le mycélium de *Phytophthora* et pour leur capacité à inhiber la croissance du *Phytophthora* par Valois (1994). Dans notre groupe de recherche, on se penche actuellement sur l'étude de la production de glucanases par les souches d'actinomycètes antagonistes. Le coté enzymologie n'étant pas le seul critère sur lequel les souches d'actinomycètes avaient été sélectionnées, on se devait d'étudier le deuxième facteur entrant dans le phénomène d'antagonisme : l'antibiose.

Des tests d'inhibition de croissance ont été faits sur une gamme de microorganismes variés: champignons, bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif. Aucune des souches d'actinomycète n'inhibait la croissance des bactéries Gram négatif. Il est reconnu que les bactéries Gram négatif sont souvent moins sensibles aux antibiotiques que les bactéries Gram positif puisque la paroi des bactéries Gram négatif est beaucoup moins perméable à cause de la présence d'une membrane externe. Les antibiotiques ne peuvent donc pas atteindre aussi facilement le cytoplasme bactérien, et ainsi sont souvent moins efficaces (Pelczar et al., 1986). Par contre, les 13 souches d'actinomycète inhibaient la croissance de toutes les souches d'oomycètes testées: *Pythium* (ce travail) et *Phytophthora* (Valois et al., 1996). Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces souches d'actinomycètes fabriquent toutes un antibiotique efficace contre les oomycètes. Toutefois, il est impossible de conclure que c'est le même antibiotique qui est produit par les 13 souches d'actinomycète.

Valois (1994) avait démontré que la majorité des souches d'actinomycète antagonistes étaient efficaces pour lutter contre le pourridié des racines du framboisier en conditions contrôlées. Si l'antibiose est un phénomène important dans la lutte biologique, on pourrait s'attendre à ce que les actinomycètes antagonistes soient aussi efficaces contre d'autres maladies causées par des oomycètes, telles la stèle rouge du fraisier causée par le *Phytophthora fragariae* var. *fragariae* ou la fonte des semis de la laitue causée par le *Pythium ultimum*, car les antibiotiques produits par les actinomycètes ne sont pas spécifiques à *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, mais agissaient contre tous les oomycètes testées. Si toutefois, l'action des glucanases était le phénomène le plus important, nos souches devraient également être efficaces contre d'autres maladies causées par les oomycètes, car les glucanases produites par les actinomycètes ne sont pas spécifiques à *Phytophthora fragariae* var. *rubi* mais agissent sur les oomycètes en général (Barasubiye et Beaulieu¹). La synergie des deux mécanismes (antibiose et glucanases) est aussi possible d'autant plus qu'il a été démontré que l'action combiné de deux mécanismes peut améliorer les rendements dans la lutte biologique contre un agent pathogène. En effet, l'utilisation simultanée de *Micromonospora carbonaceae* qui produit des cellulases détruisant la paroi fongique du *Phytophthora*, et de *Streptomyces violascens* qui produit un antibiotique inhibant la croissance du même champignon, serait plus efficace dans la lutte contre la pourriture des racines de *Banksia grandis* causée par le *Phytophthora cinnamomi*, que de l'utilisation séparée des deux agents antagonistes (El-Tarabily et al., 1996).

Certaines de nos souches antagonistes s'avéraient très efficaces à inhiber la croissance de différents types de microorganismes. Par exemple, les souches EF72 et EF76 ont inhibé la croissance de toutes les espèces de champignons testées ainsi que de toutes les bactéries Gram positif. Les souches à large spectre d'inhibition fabriquent soit un antibiotique à très large

¹Communication personnelle, janvier 1996

spectre d'inhibition ou fabriquent plus d'un antibiotique. Dans le cas de EF76 qui produit la geldanamycine, c'est vraisemblablement la première possibilité qui s'avère juste.

En effet, la geldanamycine a un spectre d'action très étendue. Elle est reconnue comme inhibant la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif (DeBoer et al., 1970), des champignons tels que le *Rhizoctonia solani* (Rothrock et Gottlieb, 1984), *Alternaria*, *Pythium*, *Botrytis* et *Penicillium* et des protozoaires comme *Crithidia fasciculata* et *Tetrahymena pyriformis* (DeBoer et al., 1970). La souche EF76 inhibait la croissance de toutes les espèces de bactéries Gram positif et de toutes les espèces de champignons testés, mais aucunement la croissance des bactéries Gram négatif. Ceci était surprenant puisque EF76 produit de la geldanamycine et que DeBoer et al. (1970) ont démontré que la geldanamycine agissait sur les bactéries Gram négatif. Il est toutefois possible que EF76 ne produit pas suffisamment d'antibiotique pour pouvoir inhiber les bactéries Gram négatif et qu'il faudrait de plus grandes quantités d'antibiotique pour inhiber leur croissance. Ceci est vraisemblable puisque DeBoer et al. (1970) ont démontré qu'il fallait une concentration plus élevée de geldanamycine pour inhiber la croissance de bactéries Gram négatif que celle nécessaire pour inhiber la croissance des bactéries Gram positif. En effet, 50 µg/ml de geldanamycine sont nécessaires pour inhiber la croissance de bactérie Gram négatif tandis que seulement 12,5 µg/ml de geldanamycine suffisent à inhiber la croissance de bactéries Gram positif.

Les souches à large spectre d'inhibition pourraient donc être étudiées quant à leur capacité à être utilisées en lutte biologique contre des agents pathogènes autres que les oomycètes. Les chances de succès sont bonnes, puisque déjà une espèce de *Streptomyces* à large spectre d'inhibition est utilisée commercialement pour lutter contre diverses maladies végétales. Le biofongicide Mycostop consistant en une souche de *Streptomyces griseoviridis* est utilisé contre divers agents pathogènes tels le *Fusarium oxysporum*, l'*Alternaria brassicicola*, le *Pythium* sp., le *Rhizoctonia solani* et le *Verticillium* sp. (Lahdenperä et al., 1991).

Lors des tests pour retrouver une activité antibiotique dans les surnageants de culture des actinomycètes antagonistes, les surnageants de deux souches seulement, EF72 et EF76, démontraient une capacité à inhiber la croissance de *Phytophthora* et ce, même si les 13 souches d'actinomycètes avaient été sélectionnées pour leur production de composés inhibant la croissance de *Phytophthora*. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer qu'aucune activité antibiotique n'a été retrouvée dans certains surnageants. Ceci peut être dû au fait que l'antibiotique produit par ces souches est instable. Le fait de récupérer l'antibiotique du surnageant de culture et de le concentrer par évaporation peut le dégrader suffisamment pour qu'il perde son activité. L'antibiotique peut aussi n'être produit qu'en très faibles quantités et son activité n'est alors pas détectable dans les conditions que nous avons utilisées. Aussi, la présence d'antibiotiques n'a été testée qu'après cinq jours de croissance, il se peut que l'antibiotique soit présent avant ou après cette période, mais pas à ce temps précis. Chez certains streptomycètes, la production d'antibiotique diminue suffisamment après 5 jours pour que leur présence devienne difficile à détecter. De plus, d'autres facteurs dont la concentration d'oxygène dans le milieu et le milieu utilisé influencent la production d'antibiotique (Chen et Wilde, 1991).

La souche de *Streptomyces* sp. EF76 a fait l'objet d'une étude plus approfondie sur l'identité de l'antibiotique qu'elle produisait parce que son spectre d'inhibition de croissance était large, que sa production d'antibiotique en milieu liquide était bonne et que son efficacité à réduire le pourridié sur framboisier était excellente (Valois et al., 1996). Des spectres de masse réalisés sur l'antibiotique purifié laissaient croire qu'il s'agissait d'un dérivé de la geldanamycine. La geldanamycine a la formule moléculaire $C_{29}H_{40}N_2O_9$, qui était représenté en faible quantité sur le spectre de masse, correspondant au pic 560 du spectre de masse, tandis que le pic observé à 517 sur le spectre de masse correspond à la formule moléculaire $C_{28}H_{39}NO_8$, qui était représentée en grande quantité sur le spectre de masse. Ce produit dérivé de la geldanamycine aurait subi la perte du radical HCON (annexe 3). L'expulsion du radical

HCON peut s'expliquer par le fait que pour prendre un spectre de masse, il faut chauffer la molécule suffisamment pour la vaporiser et ainsi, les parties les plus fragiles ou instables de la molécule peuvent se détacher. Cette hypothèse est fort plausible puisque le même phénomène a été observé par DeBoer et al. (1970) pour cette même molécule. Par contre, les spectres de résonance magnétique nucléaire viennent confirmer que le produit fabriqué par la souche EF76 est bien la geldanamycine, puisque la présence du groupement HCON peut y être observé. De plus, comme il avait été déterminé que la souche ATCC 55256 produisait un produit jaune qui était la geldanamycine et puisque les spectres de masse et de résonance magnétique des produits fabriqués par les souches EF76 et ATCC 55256 étaient pratiquement identiques, ceci vient confirmer que nous sommes bien en présence de la geldanamycine.

La geldanamycine a été rapportée comme étant produite par *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* pour la première fois en 1970 par DeBoer et al.. Ainsi, la souche d'actinomycètes EF76 pourrait également appartenir à l'espèce *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*. Il est parfois possible d'identifier une espèce bactérienne en caractérisant l'antibiotique qu'elle produit. Par exemple, Antoun et al. (1980), qui avaient isolé des actinomycètes pouvant inhiber la croissance de *Fusarium oxysporum* et des bactéries Gram positif, sont parvenus à identifier l'antibiotique produit par les actinomycètes comme étant l'endomycine. Cet antibiotique avait été rapporté comme étant produit par *Streptomyces antinycoticus*. Ce n'est qu'après avoir identifié l'antibiotique qu'ils ont identifié les souches productrices comme étant *Streptomyces antinycoticus*.

Nous avons procédé exactement comme Antoun et al. (1980) pour identifier EF76. Après avoir démontré que la souche EF76 produisait le même antibiotique que la sous-espèce *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*, nous avons comparé EF76 à une souche de cette espèce (ATCC 55256). Les tests effectués pour confirmer que la souche EF76 appartenait bien à l'espèce *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* étaient une comparaison de

certaines propriétés morphologiques, l'hybridation ADN-ADN entre les génomes de la souche EF76 et l'ADN de la souche de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256 ainsi que la comparaison des patrons de digestion de l'ADN génomique de ces mêmes deux souches. L'apparence des colonies des souches EF76 et ATCC 55256 était très semblable. De plus, le niveau d'homologie entre la souche EF76 et ATCC 55256 laisse croire que ces deux souches appartiennent à la même espèce, car le niveau d'homologie génomique se trouve à 99,9%, alors que la souche *Streptomyces scabies* EF46, servant de témoin négatif, montrait un niveau d'homologie génétique de seulement 17,5% avec la souche ATCC 55256. On considère que deux organismes doivent avoir une homologie génétique d'au moins de 70% pour être classés dans la même espèce (Scheifer et Stackebrandt, 1981). De plus, les patrons de digestion de l'ADN génomique des souches EF76 et ATCC 55256 étaient aussi très semblables (figure 3) et différaient de ceux de la souche *Streptomyces caviscabies* EF104, servant de témoin négatif. Des souches appartenant à la même espèce ont souvent des patrons de digestion semblables (Stall et al., 1994). La souche EF76 a donc été identifiée comme *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* par ses caractéristiques morphologiques, le niveau d'homologie génétique avec la souche ATCC 55256, la similitude des patrons de digestion de l'ADN génomique des souches EF76 et ATCC 55256 ainsi que par la caractérisation de l'antibiotique qu'elle produit.

En plus de son activité anti-microbienne, la geldanamycine a aussi été étudiée pour ses propriétés d'herbicide. Des quantités de 1 à 2 ppm de geldanamycine inhibent de 50% la croissance de racelles de cresson et 5 ppm du produit détruisent complètement les racelles. Les symptômes associés à la toxicité de la geldanamycine sont le brunissement et la désintégration des racelles (Heisey et Putnam, 1986). Par contre, l'application de la geldanamycine en post-émergence n'a pas d'effet négatif significatif sur la plante. C'est d'ailleurs ce que nous avons remarqué lors des essais sur framboisier. De plus, une autre étude de lutte biologique a été faite avec une souche produisant de la geldanamycine. L'introduction

de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* dans le sol de plants de fève de soya contribuait à réduire significativement les symptômes causés par *Phytophthora megasperma* var. *sojae* et *Rhizoctonia solani*. (Rothrock et Gottlieb, 1981).

La geldanamycine est aussi toxique sur les cellules animales. Une quantité de 50 µg est toxique pour la souris. Le mode d'action de la geldanamycine consisterait en l'inhibition de l'ARN polymérase dans les cellules, ce qui expliquerait pourquoi son spectre d'inhibition est aussi large et atteint aussi bien des cellules microbiennes, animales que végétales (Roza et al., 1986). En raison de la toxicité de la geldanamycine, il serait toutefois essentiel d'effectuer des analyses de résidus dans les fruits avant d'utiliser la souche EF76 commercialement comme produit de lutte biologique.

Dans notre laboratoire, des études avaient déjà été menées sur l'effet des souches d'actinomycètes sur l'indice du pourridié *in planta* (Valois, 1994). La plupart des souches antagonistes avaient significativement réduit l'indice du pourridié. Ces essais avaient par contre été faits dans un sol stérile et ne vérifiaient donc pas si la microflore du sol pouvait interférer dans la capacité des actinomycètes à inhiber le *Phytophthora*. Une étude a donc été faite en terreau non stérile avec les souches d'actinomycètes EF14 et EF76. Les résultats ont démontré que les souches d'actinomycètes EF14 et EF76 réduisaient significativement l'indice du pourridié. Cela suggère que ces souches d'actinomycètes peuvent compétitionner avec d'autres microorganismes que le *Phytophthora*. Il reste maintenant à déterminer l'efficacité de ces souches aux champs dans le but de les utiliser comme agent de lutte biologique.

CONCLUSION

Treize souches d'actinomycètes avaient été sélectionnées pour leur production d'enzymes lytiques et d'antibiotiques pouvant inhiber la croissance du *Phytophthora* (Valois, 1994). De ces souches, EF76 a été particulièrement étudiée pour sa production d'antibiotique. L'antibiotique produit par EF76 est la geldanamycine. Ce produit a une efficacité certaine dans l'inhibition du *Phytophthora in vitro*, mais est aussi efficace contre d'autres espèces de champignons et de bactéries Gram positif. De plus, il a été démontré que la souche EF76, mais également la souche EF14, avaient la capacité de réduire l'indice du pourridié des racines du framboisier. Ces souches se sont en effet avérées efficaces à réduire la maladie même en présence d'une microflore indigène. De plus, les deux souches ne causent pas de dommages à la plante, l'apparence des plants inoculés avec les actinomycètes ne diffère pas des plants témoins. Toutefois, les essais sur plantes ont été effectués dans des conditions contrôlées.

Un point crucial à vérifier est l'efficacité des souches d'actinomycètes à lutter contre le *Phytophthora fragariae* var. *rubi* au champ. De plus, en raison de la vaste gamme d'inhibition de certaines souches, il serait intéressant d'étudier leur efficacité à réprimer des maladies autres que le pourridié des racines du framboisier.

Il reste beaucoup de travail à faire pour déterminer le rôle des antibiotiques dans le pouvoir antagoniste des souches d'actinomycètes *in planta*. Entre autres, une mutagenèse des gènes de synthèse de la geldanamycine et des glucanases pourrait permettre de déterminer le rôle des enzymes et des antibiotiques produits par les actinomycètes dans la lutte biologique.

Ce travail a permis une meilleure connaissance du phénomène de l'antibiose des souches d'actinomycètes en général, mais particulièrement de la souche EF76. Ces données sont essentielles dans l'éventualité d'une commercialisation de ces souches comme outil de lutte

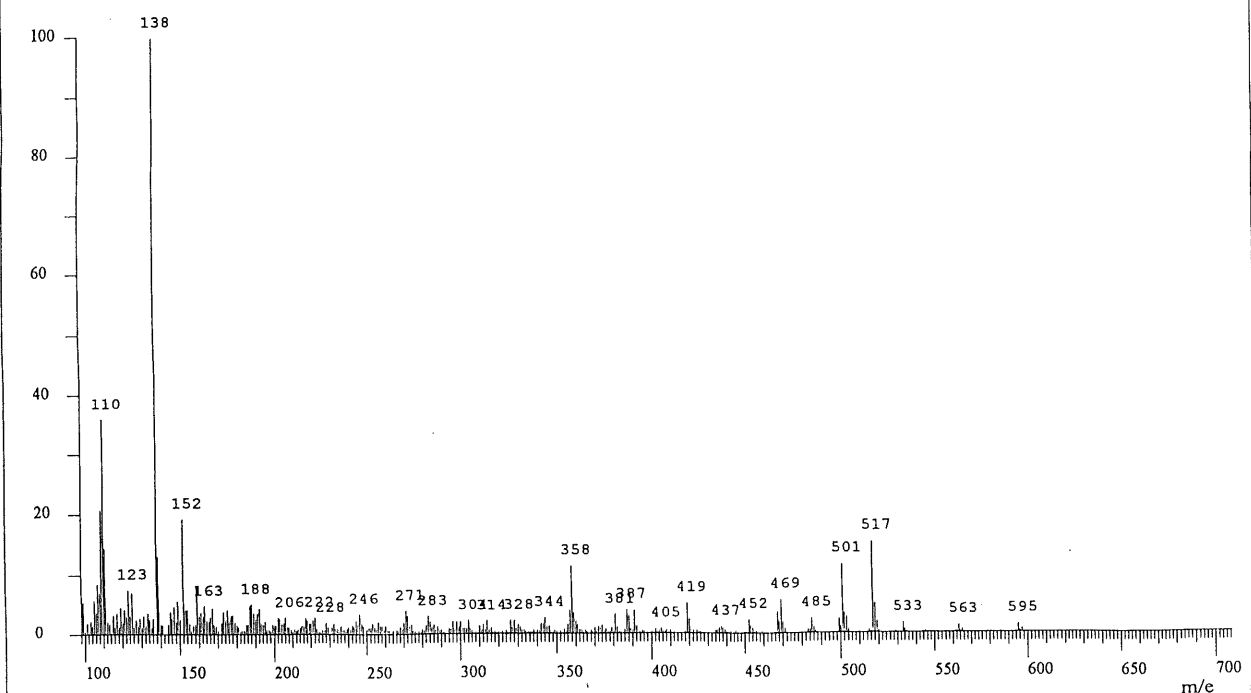
biologique. De fait, le mécanisme d'action d'un biofongicide doit être connu pour qu'il puisse être homologué. On peut être optimiste quant à l'avenir commercial des souches antagonistes puisque déjà un produit à base de *Streptomyces griseoviridis* est disponible en Europe. Le marché nord-américain reste à conquérir.

ANNEXES

Spectre de masse

c:\masspec\toussain\ef76a.mas
Échantillon : EF76 GELDANAMYCINE
9/5/1996

ionisation électronique:70eV



annexe 1A: Spectre de masse de l'antibiotique produit par la souche de *Streptomyces* sp. EF76.

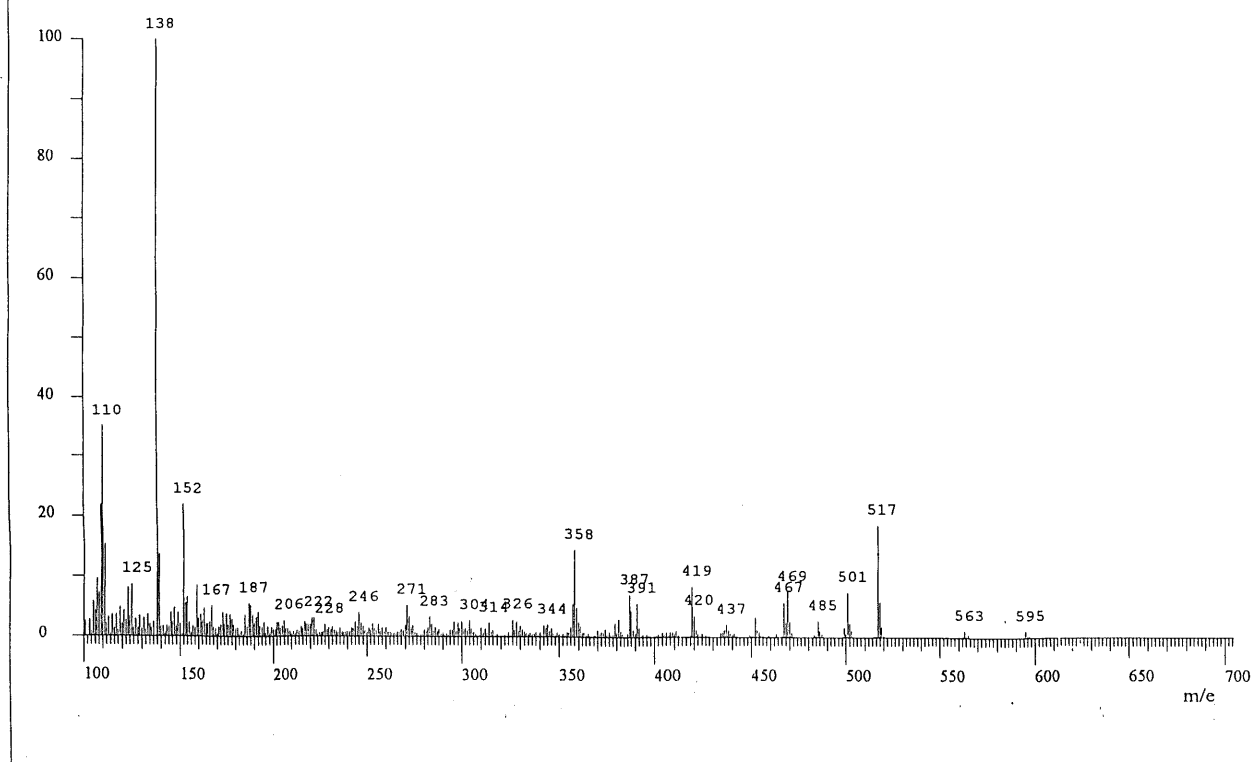
Spectre de masse

c:\masspec\toussain\at55256.mas

ionisation électronique:70eV

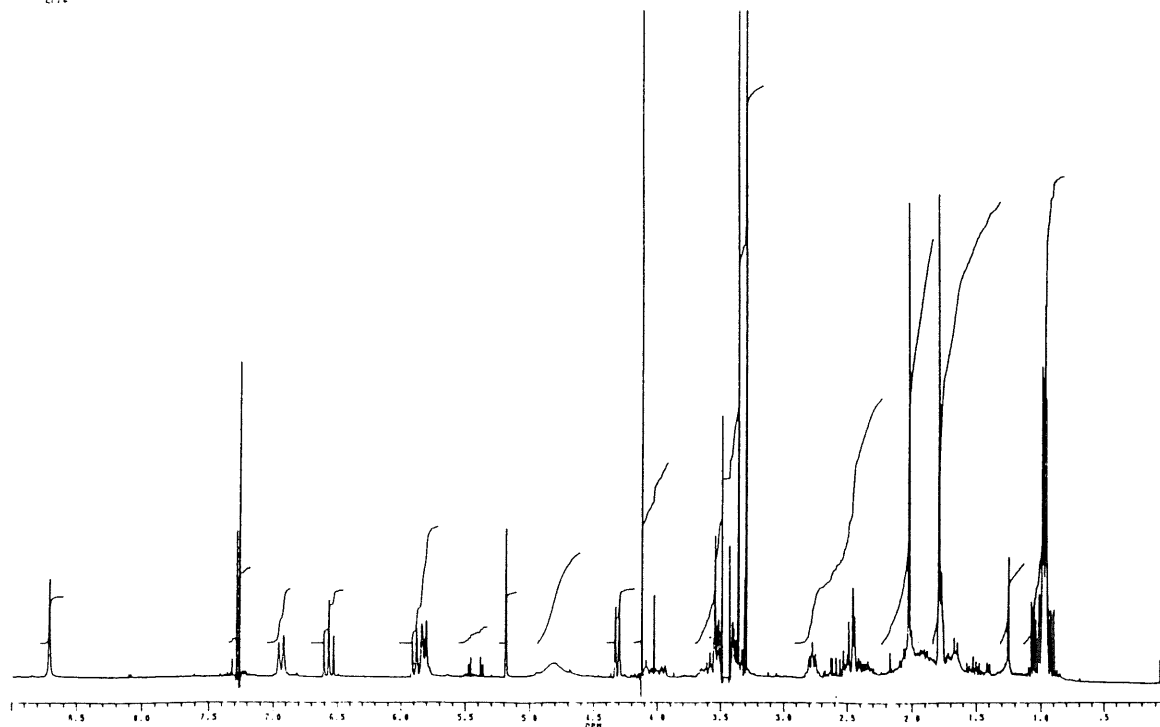
Échantillon : ATCC 55 256 GELDANAMYCINE

9/5/1996

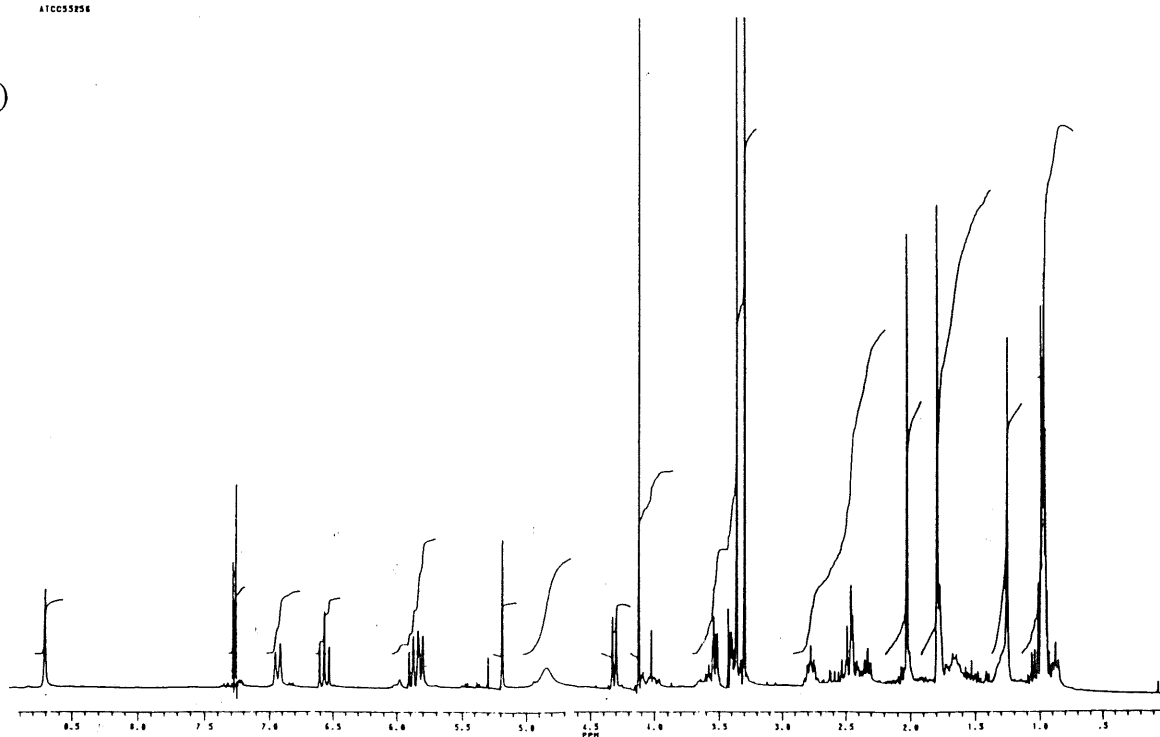


annexe 1B: Spectre de masse de la geldanamycine produite par la souche de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256.

(A)

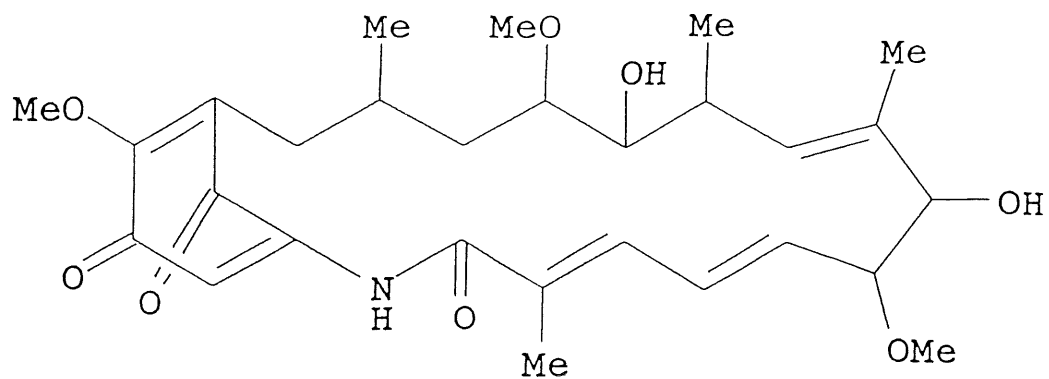


(B)

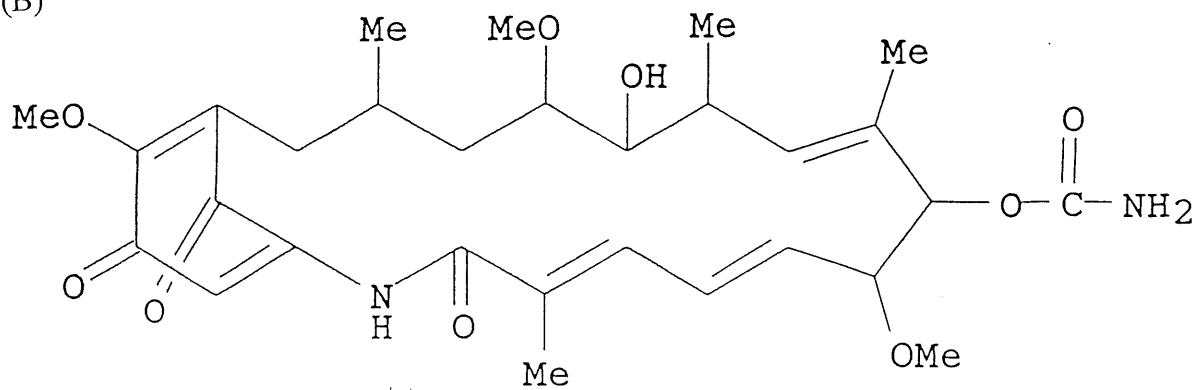


annexe 2 : Comparaison des spectres de résonance magnétique nucléaire de (A) l'antibiotique produit par la souche de *Streptomyces* sp. EF76 et (B) la geldanamycine produite par la souche de *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* ATCC 55256.

(A)



(B)



annexe 3 : (A) molécule détectée par le spectre de masse à 517 m/e et (B) Structure réelle de la geldanamycine (563 m/e sur le spectre de masse).

BIBLIOGRAPHIE

- ABER, M. et B. DROUIN. 1993. Manuel de l'observateur. Petits fruits. Réseau d'Avertissements Phytosanitaires (p.42-44).
- AGRIOS, G.N. 1988. Plant Pathology. Academic Press, San Diego, California, 801p.
- ALEXOPOULOS, C.J. et C.W. MIMS. 1979. Introductory Mycology, 3rd ed. John Wiley & Swons, New York, 632 p.
- ANTOUN, H., L.M. BORDELEAU et C. GAGNON. 1980. Identification d'un isolat d'actinomycète par la caractérisation partielle d'un antibiotique qu'il produit. *Phytoprotection* 61: 79-87.
- BARTNICKI-GARCIA, S. et M.C. WANG. 1987. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*. Pages 121-137 in *Phytophthora* Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao, eds. St.Paul, MN, 392 pp.
- BRETON, G. 1991. État de la situation de la culture de la framboise au Québec. Colloque sur la framboise: "Point sur la culture". pp 7-14.
- BROADBENT, P., K.F. BAKER, et Y. WATERWORTH. 1971. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soils. *Aust. J. Biol. Sci.* 24: 925-944.
- BRUCK, R.I., W.E. FRY, et A.E. APPLE. 1980. Effect of Metalaxyl, an acylalanine fungicide, on developmental stages of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*. 70: 597-601.
- CHEN, H.C. et F. WILDE. 1991. The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. *Biotech. Bioengineer.* 37: 591-595.
- CONVERSE, R.H. et C.D. SCHWARTZE. 1965. *Phytophthora* sp. from Washington pathogenic roots of red raspberry. *Phytopathology*. 55: 503 (abstract).
- CONVERSE, R.H. et C.D. SCHWARTZE. 1968. A root rot of red raspberry caused by *Phytophthora erythroseptica*. *Phytopathology* 58: 56-59.
- CORBAZ, R. 1990. Principes de phytopathologie et de lutte contre les maladies des plantes. Presses polytechniques et universitaires romandes. Lausanne. 286 p.

CRAWFORD, D.L., J.M. LYNCH, J.M. WHIPPS et M.A. OUSLEY. 1993. Isolation and characterization of Actinomycete antagonists of a fungal root pathogen. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3899-3905.

DEBOER, C., P.A. MEULMAN, R.J. WNUK et D.H. PETERSON. 1970. Geldanamycin, a new antibiotic. J. Antibiot. 23: 442-447.

DEBOER, C. et A. DIETZ. 1976. The description and antibiotic production of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*. J. Antibiot. 29: 1182-1188.

DEWITT, J.P. 1985. Evidence for a sex factor in *Streptomyces erythraeus*. J. Bacteriol. 164: 969-971.

DUNCAN, J.M., D.M. KENNEDY et E. SEEMÜLLER. 1987. Identities and pathogenicities of *Phytophthora* spp. causing root rot of red raspberry. Plant Pathol. 36: 276-289.

DUNCAN, J.M., D.M. KENNEDY, P.H. SCOTT. 1991. Relationships between non-papillate, soilborne species of *Phytophthora*: root rot of raspberry. P. 129-139. In *Phytophthora*. J.A. Lucas, R.C. Shattock, D.S. Shaw, L.R. Cooke. Cambridge University Press, New York.

DUPUY, A.C. 1992. Hydrolyse enzymatique de la chitine et de son produit déacétylé, le chitosane, effectuée par des actinomycètes isolés à partir de différents sols canadiens. Mémoire de Maîtrise. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université de Sherbrooke.

EL-TARABILY, K.A., M.L. SYKES, I.D. KURTBÖKE, G.E. ST. J. HARDY, A.M. BARBOSA et R.F.H. DEKKER. 1996. Synergistic effects of cellulase-producing *Micromonospora carbonacea* and an antibiotic-producing *Streptomyces violascens* on the suppression of *Phytophthora cinnamomi* root rot of *Banksia grandis*. Can. J. Bot. 74: 618-624.

FAUCHER, E., T. SAVARD et C. BEAULIEU. 1992. Characterization of actinomycetes isolated from common scab lesions on potato tubers. Can. J. Plant Pathol. 14: 197-202.

FRY, W.E., S.B. GOODWIN, A.T. DYER, A. DRENTH, P.W. TOOLEY, S. SUJKOWSKI, Y.J. KOH, B.A. COHEN, L.J. SPIELMAN, K.L. DEAHL, D.A. INGLIS ET K.P. SANDLAN. 1993. Historical and recent migrations of *Phytophthora infestans*: chronology, pathways, and applications. Plant Disease. 77: 653-661.

GARAND C., C. BEAULIEU, P.M. CHAREST, R. HOGUE ET S. LABERGE. 1994. Detection of *Phytophthora* species causing root rot of raspberry in Quebec. *Phytopathology* 85: 1556.

HEIBERG, N. 1995. Control of root rot of red raspberries caused by *Phytophthora fragariae* var. *rubi*. *Plant Pathol.* 44: 153-159.

HEISEY, R.M. et A.R. PUTMAN. 1986. Herbicidal effects of geldanamycin and nigericin, antibiotics from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Nat. Products.* 49: 859-865.

HEISEY, R.M. et A.R. PUTMAN. 1990. Herbicidal activity of the antibiotics geldanamycin and nigericin. *J. Plant Growth Regul.* 9:19-25.

HOMMA, Y. 1984. Perforation and lysis of hyphae of *Rhizoctonia solani* and conidia of *Cochliobolus miyabeanus* by soil myxobacteria. *Phytopathology* 76: 1260-1264.

HOPWOOD, D.A., M.J. BIBB, K.F. CHATER, T. KEISER, C.J. BRUTON, H.M. KIESER, D.J. LYDIATE, C.P. SMITH, J.M. WARD, H. SCHREMPF. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. F. Crowe and Sons Ltd. The John Innes Foundation, Norwich, England, 355pp.

HOWELL, C.R. et R.D. STIPANOVIC. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, pyoluterin. *Phytopathology* 70: 712-715.

HWANG, B.K., S.J. AHN et S.S. MOON. 1994. Production, purification, and antifungal activity of the antibiotic nucleoside, tubercidin, produced by *Streptomyces violaceoniger*. *Can. J. Bot.* 72: 480-485.

KING, R.B., C.H. LAURENCE et M.C. CLARK. 1991. Correlation of phytotoxin production with pathogenicity of *Streptomyces scabies* isolated from scab infected potato tubers. *Am. Potato J.* 68: 675-680.

KNAUSS, J.F. 1976. *In vitro* antagonistic activity of several *Streptomyces* spp. against species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Plant Dis. Report.* 60: 846-850.

LAHDENPERÄ, M.L., E. SIMON et J. UOTI. 1991. Mycostop - A novel biofungicide based on *Streptomyces* bacteria, p 258-263. In : A.B.R. Beemster, G.J. Bollen, M. Gerlach, M.A. Ruissen, B. Schippers, R.A. Tempel (ed.), Biotic interactions and soil-borne disease, Proc. 1st Conf. of the European Foundation for Plant Pathology, Elsevier.

- MALAJCZUK, N. 1983. Microbial antagonism to *Phytophthora*, p. 197-218. In D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P.H. Tsao (ed.), *Phytophthora: its biology, taxonomy, ecology and pathology*. APS Press, St. Paul, Minn.
- McKEEN, W.E. 1958. Red stele root disease of the loganberry and strawberry caused by *Phytophthora fragariae*. *Phytopathology* 48: 129-132.
- NICKERSON, N.L. 1990 Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora fragariae* in Nova Scotia. Strawberry Newsletter no. 4, Department of Agriculture and Marketing, Nova Scotia.
- NOURRISSEAU, G. Et A. BAUDRY. 1987. Un *Phytophthora* cause de dépérissement du framboisier en France. *Phytoma* 394: 26-32.
- PARADIS, E., C. GOYER, N.C. HODGE, R. HOGUE, R.E. STALL ET C. BEAULIEU. 1994. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in Eastern Canada. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 561-564.
- PELCZAR, M.J., E.C.S. CHAN et N.R. KRIEG. 1986. *Microbiology*. McGraw-Hill, Inc. New York. 918 pp.
- PRIDHAM, T.G., P. ANDERSON, C. FOLEY, L.A. LINDENFELSER, C.W. HESETINE et R.G. BENEDICT. 1956-57. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiot. Annu.* 1956-57: 947-953.
- RIBEIRO, O.K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. J. Cramer, Lehre, Germany. 420 p.
- ROTHROCK, G.S. et D. GOTTLIEB. 1981. Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. *J. Antibiot.* 34(7): 830-835.
- ROTHROCK, G.S. et D. GOTTLIEB. 1984. Role of antibiosis in antagonism of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus* to *Rhizoctonia solani* in soil. *Can. J. Microbiol.* 30:1440-1447.
- ROZA, J., M.G. BLANCO, C. HARDISSON et J.A. SALAS. 1986. Self-resistance in actinomycetes producing inhibitors of RNA Polymerase. *J. Antibiot.* 29:609-612.
- SCHEIFER, K.H. et E. STACKBRANDT. 1981. Molecular systematics of prokaryotes. *Ann. Rev. Microbiol.* 37: 143-187.

SEEMÜLLER, E., J.M. DUNCAN, D.M. KENNEDY et M. RIEDEL. 1986. *Phytophthora* sp. Als Ursache einer wurzelfäule an Himbeere. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes. 38: 17-21.

STALL, R.E., C. BEAULIEU, D. EGEL, N.C. HODGE, R.P. LEITE, G.V. MINSAVAGE, H. BOUZAR, J.B. JONES, A.M. ALVAREZ ET A.A. BENEDICT. 1994. Two genetically diverse groups of strains are included in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Int. J. Syst. Bacteriol. 44: 47-52.

THIBODEAU, P.O. 1991. Framboisier : pourridié des racines (*Phytophthora*). Avertissement phytosanitaire, réseau des petits fruits, communiqué 4.

VALOIS, D., K. FAYAD, T. BARASUBIYE, M. GARON, C. DÉRY, R. BRZEZINSKI et C. BEAULIEU. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, the causal agent of raspberry root rot. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1630-1635

VALOIS, D. 1994. Caractérisation d'actinomycètes antagonistes aux *Phytophthora* spp. responsables du pourridié des racines de framboisier. Mémoire de Maîtrise. Département de Biologie. Faculté des Sciences. Université de Sherbrooke.

WALTER, M.Y. et D.L. CRAWFORD. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Appl. Environ. Microbiol. 61-8: 3119-3128.

WASHINGTON, W.S. 1988. *Phytophthora cryptogea* as a cause of root rot of raspberry in Australia: resistance of raspberry cultivars and control by fungicides. Plant Pathol. 37: 225-230.

WATERSON, J.M. 1937. A note on the association of species of *Phytophthora* with a "Die-back" disease of the raspberry. Trans. Botani. Soc. Edinburgh. 32: 251-259.

WILCOX, W.F. 1989. Identity, virulence and isolation frequency of seven *Phytophthora* spp. causing root rot of raspberry in New York. Phytopathology. 79: 93-101.

ZENTMYER, G.A. 1987. The world of *Phytophthora*. Page 1-7 in *Phytophthora* its biology, taxonomy, ecology and pathology. D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia and P.H. Tsao, eds. APS, St. Paul, MN. 392 pp.